А.Я. Зверева¹, В.М. Брюханов¹, Ю.Г. Мотин²

СУТОЧНЫЕ КОЛЕБАНИЯ МОЧЕГОННОГО ДЕЙСТВИЯ ФУРОСЕМИДА У КРЫС

A.Ya. Zvereva, V.M. Bruhanov, Yu.G. Motin

DAILY FLUCTUATIONS OF FUROSEMIDE DIURETIC EFFECT AT RATS

Кафедры ¹фармакологии и ²гистологии Алтайского медицинского университета, г. Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Определение зависимости диуретической активности фуросемида от времени его введения крысам и выяснение возможных причин выявленных различий. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** В экспериментах на крысах определяли суточные колебания мочегонного действия фуросемида у крыс и гистологически – функциональную активность клеток дистальных канальцев почек (с помощью цитоморфометрии). Измеряли диурез через 6 и 24 ч после введения препарата, детектировали содержание Na, K, креатинина, а также фуросемида, рассчитывали ядерно-цитоплазматические отношения в эпителиоцитах дистальных канальцев, соотношение активных и неактивных почечных клеток. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Введение фуросемида в 12.00 приводило к быстрому развитию мочегонного действия, сохранявшегося на протяжении суток, существенному росту выделения натрия и калия, увеличению суточной экскреции креатинина. При введении фуросемида в 24.00 были обнаружены ряд количественных отличий: более выраженные диуретический и особенно натрийуретический эффекты, увеличение экскреции калия и креатинина в ночные часы. Данные цитоморфометрии косвенно подтвердили, что во время темного периода суток у крыс функциональная активность почек существенно выше, чем в дневное время. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Мочегонное действие фуросемида у крыс подвержено циркадианным колебаниям и более выражено в ночное время. Суточные колебания в действии фуросемида у крыс обусловлены изменениями функциональной активности почек на протяжении суток.

Ключевые слова: фуросемид, функция почек, суточные колебания.

ABSTRACT

THE AIM. Definition of furosemide diuretic activity dependence from time of its introduction to rats and identification of revealed distinctions possible reasons. **MATERIALS AND METHODS.** In experiments on rats daily fluctuations of furosemide effect was defined and histologically – functional activity of renal tubule cells capacity (by means of cytomorphometry). Diuresis was measured in 6 and 24 hours after administration, containing of Na, K, creatinine and furosemide was detected, nuclear-cytoplasmatic relations in epithelial cells of renal tubules and correlation of active and inactive renal cells were counted. **RESULTS.** Furosemide introduction at 12.00 led to fast increasing of diuretic activity preserving during the day, substantial growth of sodium and potassium rejection, increase of daily creatinine excretion. At furosemide introduction at 24.00 number of quantitative differences was found: more significant diuretic and especially natriuretic effect, increase of potassium and creatinine excretion at night. Cytomorphometry data indirectly confirmed that during the dark period of day functional renal activity of rats is essentially higher than at day-time. **CONCLUSION.** Diuretic effect of furosemide at rats is subject to circadian fluctuations and is more expressed at night. Daily fluctuations in furosemide effect at rats operation are caused by changes of functional renal activity during the day.

Key words: furosemide, kidney function, daily fluctuations.

ВВЕДЕНИЕ

Интенсивные исследования, проводимые в последние годы в рамках относительно нового раздела науки хронофармакологии, позволили установить, что действие и безопасность многих лекарственных средств в значительной степени опреде-

ляются суточными (циркадианными) ритмами и варьируются в зависимости от времени их поступления в организм. Поэтому одним из подходов к повышению эффективности фармакотерапии является введение лекарственных препаратов в такое время, когда они наиболее эффективны и/или наиболее переносимы [1–3].

Ранее в ряде лабораторий были показаны циркадианные колебания активности петлевого диуре-

Зверева А.Я. 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский медицинский университет, кафедра фармакологии. Тел.: (3852)26-08-35; E-mail: zver@asmu.ru

тика фуросемида, широко применяемого при многих сердечно-сосудистых и почечных заболеваниях. При этом описанные флюктуации мочегонного эффекта препарата как у людей [4–6], так и у животных [7–9] имели противоречивый характер.

Целью настоящей работы явилось определение зависимости диуретической активности фуросемида от времени его введения крысам и выяснение возможных причин выявленных различий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Работа проведена на 40 крысах Wistar обоего пола средней массой около 200 г в осенний период в условиях светового режима, характеризовавшегося чередованием по 12 ч светлого (день) и темного (ночь) периодов. Животные находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи, в условиях стандартной диеты при свободном доступе к воде и пище. После 10-дневного периода стабилизации, в ходе которого у каждой крысы определялись контрольные показатели функции почек, первой группе животных внутрибрюшинно вводили фуросемид в дозе 20 мг/кг в 12.00, второй группе – в 24.00. Введенное количество фуросемида в зависимости от массы тела колебалось от 3,6 до 4,2 мг. Измеряли диурез через 6 и 24 ч после введения препарата. В собранной моче определяли содержание Na, K и креатинина, служившего мерой клубочковой фильтрации, а также фуросемида. Электролиты детектировали методом пламенной фотометрии, креатинин – модифицированным методом Поппера, фуросемид – с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В качестве элюентов использовались 80% ацетонитрил при градиенте – от 0 до 100% и фосфатный буфер (рН=7). Детектирование проводилось при трех длинах волн – 210, 280, 320 нм. Для расчетов применялся калибровочный график, который строили, используя стандартный раствор фуросемида в концентрации 1 мг/мл.

Крыс декапитировали путем дислокации шейного позвонка под эфирным наркозом с соблюдением требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.) и Федерального закона Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г. Материалом гистологического исследования послужила почка крысы. Почку забирали в середине светлого и темного периодов (в 14.00 и в 2.00), а также через 2 ч после введения фуросемида, фиксировали в 10% растворе формалина, обрабатывали по стандартной методике, за-

ливали в парафин. Поперечные срезы через почечный сосочек толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином – эозином.

Для определения биосинтетической активности и общей функциональной жизнеспособности клеток использовали полихромную методику окраски сафранином-О (Т) по А.Н.Яцковскому [10], дающую возможность судить о клеточной активности по степени конденсации хроматина.

Морфометрические исследования проводили с использованием программного пакета Axio Vision 4.7 («Carl Zeiss», Germany). Рассчитывали известное ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) в эпителиоцитах дистальных канальцев нефронов области наружной медуллы по формуле: $ЯЦО = S_{\text{ядра}} / (S_{\text{клетки}} - S_{\text{ядра}})$, где $S_{\text{ядра}}$ – площадь ядра эпителиоцита в мкм², $S_{\text{клетки}}$ – площадь клетки в мкм². Помимо этого, оценивали размер просвета дистальных почечных канальцев в мкм².

Полученные результаты обрабатывали статистически методом вариационных рядов с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из результатов, представленных в табл. 1, введение фуросемида в 12.00 приводило к быстрому и мощному мочегонному эффекту. Так, уже за 6 ч, прошедших после введения препарата, выделялось мочи на 39% больше, чем за сутки в исходном периоде ($p < 0,05$). Выраженный диуретический эффект сохранялся, обеспечивая равномерный прирост, на протяжении суток, в конце которых мочеотделение в 3,5 раза превосходило контрольные значения. Иная динамика характеризовала экскрецию натрия. За первые 6 ч выделение этого иона в 75 раз превышало уровень исходной суточной экскреции, что обеспечивало почти 91% суточного натрийуретического эффекта. За следующие 18 ч величина экскреции натрия составила лишь 9% от суммарного суточного выделения. Сходным образом, хотя и более равномерно, распределялась в пределах суток экскреция калия. За первые 6 ч выделилось 73% от суточного калийуреза, который, в свою очередь, в 7 раз превосходил контрольный уровень.

Важно отметить, что динамика экскреции с мочой фуросемида практически соответствовала таковой для выделения натрия. Так, из вводимых в среднем $3,8 \pm 0,08$ мг препарата в первые 6 часов в моче обнаруживалось 57,4%, что составило 93% от выделившегося за сутки фуросемида. Следует отметить, что введение фуросемида в дневные часы сопровождалось существенным увеличени-

Таблица 1

Влияние дневного введения фуросемида (20 мг/кг) на функцию почек у крыс

Показатели	Исходный суточный уровень	Введение фуросемида		
		За 6 ч	За 18 ч	За 24 ч
Диурез, мл	5,1±0,76	7,1±0,35	10,4±1,95	17,6±2,16
Экскреция Na ⁺ , мкмоль	31±3,0	2338±183,8	191±48,0	2576±225,0
Экскреция K ⁺ , мкмоль	175±14,1	854±30,3	307±31,2	1170±37,6
Экскреция креатинина, мкмоль	8,5±0,33	3,7±0,17	10,7±0,46*	14,4±0,42*
Экскреция фуросемида, мг	-	2,18±0,066	0,16±0,032	2,34±0,084

Примечание. Здесь и в табл. 2 все цифры выделения воды и электролитов после введения фуросемида достоверно превосходят суточные показатели интактных крыс; звездочками обозначены достоверные отличия от исходного уровня.

Таблица 2

Влияние ночного введения фуросемида (20 мг/кг) на функцию почек у крыс

Показатели	Исходный суточный уровень	Введение фуросемида		
		За 6 ч	За 18 ч	За 24 ч
Диурез, мл	3,8±0,43	8,1±0,50	4,7±0,81	12,8±1,03
Экскреция Na ⁺ , мкмоль	28±3,4	3056±185,1	186±19,9	3241±184,7
Экскреция K ⁺ , мкмоль	153±10,8	1137±64,7	197±14,2	1335±67,0
Экскреция креатинина, мкмоль	7,6±0,33	4,5±0,30	7,8±0,37	12,3±0,47*
Экскреция фуросемида, мг	-	2,17±0,189	0,095±0,005	2,27±0,180

ем суточной экскреции креатинина. Рост последнего показателя на 69% по сравнению с исходным уровнем, по-видимому, внес вклад в развитие диуретического действия препарата. При этом выделение креатинина распределялось равномерно в пределах суток и за первые 6 ч составило около 25%.

При введении фуросемида в 24.00 при качественно сходной картине был обнаружен ряд количественных отличий. Из табл. 2 видно, что в первые 6 ч после введения диуретик оказал более выраженное воздействие на почечную функцию, которое затем в дневные часы значительно ослаблялось. Так, за 6 ч, прошедшие после введения, объем собранной мочи в 2 раза превышал исходный суточный уровень и был несколько (хотя и недостоверно) выше диуреза за соответствующий период при введении фуросемида днем. Затем на протяжении следующих 18 ч прирост диуреза у этих животных существенно снижался в сравнении с крысами, получавшими диуретик днем, и через сутки был уже на 27% ниже, чем у последних. Из той же табл. 2 следует, что экскреция натрия в этих экспериментальных условиях значительно превосходила уровень, достигнутый при введении фуросемида днем. При этом выделение электролита не только в 109 раз превышало суточные показатели в контроле, но и на 26% превосходил соответствующие величины, полученные при дневном введении ($p < 0,05$). Это мощное натрийуретическое действие, развившееся за первые 6 ч после ночного введения фуросемида, составило 94% от суточного эффекта, так что на оставшиеся 18 ч пришлось лишь 6%. И все же благодаря столь выраженному натрийурезу, развившемуся в первые (ночные) часы, суммарная

суточная экскреция натрия значительно превосходила таковую, достигнутую при введении диуретика днем. Аналогичная динамика была характерна и для экскреции калия. За первые 6 ч выделилось 85% от уровня суточного калийуреза, что было на 14% больше, чем в результате воздействия фуросемида днем. Интересно, что величина экскреции фуросемида в этих условиях мало отличалась от показателей, полученных при введении диуретика днем, и достигала 55,6% от введенной дозы за первые 6 ч, что составило 96% от суточной экскреции препарата. Экскреция креатинина, в целом, соответствовала выявленной тенденции: значительный рост в первые 6 ч после введения фуросемида (около 37% от суточной экскреции) с менее интенсивным приростом в последующие часы. В результате – суточное выделение креатинина в этих условиях на 62% превосходило исходный уровень.

Проведенное морфологическое исследование опосредованно подтвердило, что у крыс во время темного периода суток функциональная активность почек существенно выше, чем в дневное время. Об этом говорит статистически значимое увеличение ЯЦО эпителиоцитов дистальных канальцев нефрона в ночное время, указывая на усиление их функциональной активности и более высокий уровень метаболизма в клетках дистальных канальцев, как это следует из результатов, представленных в табл. 3. Более высокая активность функционирования дистальных канальцев в темный период времени подтверждается и значительным расширением их просвета, что свидетельствует об увеличении объема протекающей по канальцу мочи. В составе эпителиальной выстилки дис-

Изменения активности клеток дистальных канальцев нефрона крыс по данным морфометрического исследования до и после введения фуросемида (20 мг/кг)

Показатели	Интактные крысы		После введения фуросемида	
	День	Ночь	День	Ночь
ЯЦО	0,48±0,017	0,67±0,017*	0,65±0,016*	0,66±0,016*
Размер просвета дистального канальца, мкм ²	31±7,2	63±6,8*	55±7,1*	72±6,9*
Функциональная активность эпителиоцитов, %	77	91	85	82

Примечание. ЯЦО – ядерно-цитоплазмное отношение; звездочками обозначены достоверные отличия от показателей интактных крыс в дневное время.

тальных канальцев ночью отмечалось увеличенное количество эпителиоцитов (до 91%), ядра которых содержат эухроматин, что указывает на более высокую степень активности биосинтетических процессов в клетках. Количество таких функционально активных клеток ночью оказалось на 18% большим, чем в дневное время.

Из той же таблицы следует, что введение фуросемида как в дневной, так и в ночной период суток мало повлияло на морфофункциональные изменения дистальных канальцев нефрона. Лишь просвет дистальных канальцев в большей степени возрастал при введении ночью, хотя и дневное применение диуретика приводило к увеличению этого показателя по сравнению с соответствующим периодом времени у интактных животных. Остальные оцениваемые морфометрические показатели на фоне введения фуросемида мало отличались от таковых, свойственных интактным крысам в ночное время.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты позволяют сделать целый ряд важных выводов и предположений. В первую очередь, подтвержден факт более активного острого действия фуросемида у крыс в ночные часы. Прирост уровня мочеотделения, экскреции калия и особенно натрия в первые 6 ч после ночного введения диуретика превосходил эффект, полученный после применения препарата в дневные часы. Для нас это не явилось сюрпризом, если учесть, что крысы относятся к грызунам, ведущим активный образ жизни в ночное время, т.е. имеющим обратный суточный ритм в сравнении с человеком и так называемыми дневными животными. Так что наблюдавшиеся в наших экспериментах отличия, по всей вероятности, были обусловлены различной функциональной активностью почек крыс в дневное и ночное время. Косвенным подтверждением этого явились данные цитоморфометрии почечных срезов. Оказалось, что использованные нами морфометрические показатели, отражающие уровень метаболизма и биосинтетической активности в ночной период времени, были существенно выше, чем

в дневной. Об этом, в частности, говорит более высокое ядерно-цитоплазмное отношение и величина просвета дистальных канальцев в ночное время. Наконец, признаком более высокой клеточной активности в этот период суток является увеличение количества клеток, ядра которых содержат эухроматин и пополнение популяции которых происходит, главным образом, за счет активации ранее неактивных клеток [10]. Это же подтверждается и более высоким приростом скорости клубочковой фильтрации в первые 6 ч после ночного введения препарата. Попутно отметим, что независимо от времени применения фуросемида его воздействие на выделение из организма воды и натрия существенно различалось. Если прирост диуреза равномерно распределялся на протяжении суток, динамика экскреции электролитов, и, в первую очередь, натрия носила иной характер. Более 90% выделившегося натрия приходится на первые 6 ч и лишь менее 10% – на оставшиеся 18 ч. Из этого следует, что, возможно, для создания адекватного диуреза вполне достаточно значительно менее сильного подавления канальцевой реабсорбции натрия. Этот вопрос, касающийся тактики применения и дозировки фуросемида, требует дальнейшего изучения.

Важно отметить, что введение фуросемида в дневное, но не в ночное время, как следует из полученных результатов, приводило к существенному росту активности почечных клеток, по-видимому, за счет имеющихся резервных возможностей. В то же время, применение препарата в любое время не приводило к значительным изменениям в сравнении с ночными показателями интактных крыс. Не исключено, что в этот период времени клетки функционируют на уровне своего максимума, и введение фуросемида не способно существенно изменить основные параметры их жизнедеятельности.

Интересно, что в наших экспериментах экскреция фуросемида четко коррелировала с выделением натрия (но не воды!) и практически не различалась при его введении днем и ночью. Последний факт заслуживает особого внимания и может быть объяснен следующим образом. Хорошо известно,

что фуросемид, как и большинство других диуретиков, попадает в почечные каналы, главным образом, путем секреции в S_2 сегменте проксимальных канальцев с помощью системы транспорта органических анионов [11]. По-видимому, этот процесс не подвергается существенным циркадианным колебаниям, что и обуславливает отсутствие каких-либо различий в его экскреции. Наблюдавшиеся же суточные осцилляции в действии фуросемида, по всей вероятности, зависят от флюктуации процесса канальцевой реабсорбции, что находит подтверждение в недавно опубликованных работах [12–15].

Наконец, в нашей работе выявлен еще один интересный факт. После мощного, но кратковременного действия фуросемида, особенно в ночные часы, происходило значительное ослабление эффекта, приходившееся в основном на последующий дневной период времени, что ослабляло суммарное суточное влияние диуретика. Эта особенность действия петлевых диуретиков, когда острое ударное воздействие (0–6 ч после введения) сменяется так называемым рикошетом в последующие 6–24 ч известна в клинике, что несколько ослабляет их эффективность и делает сопоставимыми с тиазидовыми диуретиками [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Мочегонное действие фуросемида у крыс подвержено циркадианным колебаниям и более выражено в ночное время.

2. Суточные колебания в действии фуросемида у крыс обусловлены изменениями функциональной активности почек на протяжении суток.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Арушанян ЭБ. *Хронофармакология*. Изд. СГМА, Ставрополь, 2000; 215-230
2. Ohdo S. Chronopharmacology focused on biological clock. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22(1): 3-14
3. Ohdo S. Chronopharmacology: pharmaceuticals focused on biological rhythm. *Biol Pharm Bull* 2010; 33(2): 159-167
4. Meyer BH, Müller FO, Gray IP, Grigoleit HG. Furosemide chronopharmacology. *S Afr Med J* 1982; 62(26): 975-978
5. Hemal AK, Thind SK, Nath RA et al. A comparative study of diuretic, natriuretic, and kaluretic effects of furosemide when administered at 7:00 h and 19:00 h. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1988; 26(6): 314-316
6. Tateishi T, Fujimura A, Miura T, Ebihara A. Chronopharmacological study of furosemide in human subjects. *J Clin Pharmacol Res* 1988; 8(6): 401-407
7. Зверев ЯФ, Брюханов ВМ. Влияние циркадных ритмов на выраженность диуретического эффекта фуросемида у крыс. *Нефрология* 2006; 10 (2): 77-80
8. Fujimura A, Ebihara A. Chronopharmacological study of furosemide in rats. *Life Sci* 1986; 38(13): 1215-1220
9. Fujimura A, Shiga T, Sudoh T et al. Daily variation in the effect of furosemide in rats. *Japan J Pharmacol* 1992; 60(4): 323-326
10. Яцковский АН. Метод оценки функциональной активности клеточных ядер. *Архив гистол эмбриол* 1987; 42(1): 76-79
11. Брюханов ВМ, Зверев ЯФ. *Побочные эффекты современных диуретиков. Метаболические и токсико-аллергические аспекты*. ЦЭРИС, Новосибирск, 2003; 155-158
12. Брюханов ВМ, Зверева АЯ. Роль почки в регуляции суточных ритмов организма. *Нефрология* 2010; 14(3): 17-31
13. Rohman MS, Emoto N, Nonaka H et al. Circadian clock genes directly regulate expression of the Na^+/H^+ exchanger NHE_3 in the kidney. *Kidney Int* 2005; 67: 1410-1419
14. Nishinaga H, Komatsu R, Doi M et al. Circadian expression of Na^+/H^+ exchanger NHE_3 in the mouse renal medulla. *Biomed Res* 2009; 30 (2): 87-93
15. Арушанян ЭБ, Батурич ВА, Попов АВ. Супрахиазматическое ядро гипоталамуса как регулятор циркадианной системы млекопитающих. *Успехи физиол наук* 1988; 19 (2): 67-86
16. Gumz ML, Stow LR, Lynch IJ et al. The circadian clock protein Period 1 regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice. *J Clin Invest* 2009; 119 (8): 2423-2434
16. Reyes AJ, Leary WP. Clinicopharmacological reappraisal of the potency of diuretics. *Cardiovasc Drugs Ther* 1993; 7 [suppl 1]: 23-28

Поступила в редакцию 10.02.2011 г.

Принята в печать 18.11.2011 г.