

© Я.Ф.Зверев, В.М.Брюханов, 2006  
УДК 616.12-008.331/351:615.254-092.4

*Я.Ф. Зверев, В.М. Брюханов*

## ВЛИЯНИЕ ЦИРКАДНЫХ РИТМОВ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ ДИУРЕТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ФУРОСЕМИДА У КРЫС

*Ya.F. Zverev, V.M. Bryukhanov*

## THE INFLUENCE OF CIRCADIAN RHYTHMS ON THE DEGREE OF A DIURETIC EFFECT OF FUROSEMIDE IN RATS

Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г.Барнаул, Россия

### РЕФЕРАТ

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Нас заинтересовал вопрос о возможной флюктуации эффекта диуретиков, препаратов, которые также широко применяются в кардиологической клинике в зависимости от суточных ритмов у крыс. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследовали возможность флюктуации фармакологического эффекта фуросемида (20 мг/кг внутривенно) в зависимости от суточных биоритмов у крыс массой 200-250 г. Оценивали эффект препарата после введения в 12 часов дня и в 12 часов ночи. На протяжении суток каждые 6 часов измеряли диурез, экскрецию натрия, калия и креатинина. Затем действие фуросемида исследовали у крыс, половина из которых на протяжении 7 суток находилась в темном помещении, половина – в условиях воздействия дневного освещения. В третьей серии экспериментов в течение 7 суток извращали циркадную ритмичность, помещая животных днем на 12 часов в темное помещение, а ночью включая свет. Части животных вводили препарат в 12 часов дня, части – в 12 часов ночи. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** У крыс, получавших диуретик в 12 часов дня, уровень суточного мочеотделения был примерно на 40%, а экскреции  $\text{Na}^+$  – на 30% выше, чем у животных, которым фуросемид вводили в 12 часов ночи. Отмеченный прирост обеспечивался в ночное время, поскольку в первые 6 часов после введения различий в действии препарата не наблюдалось. Введение фуросемида крысам, длительно находившимся в темноте, приводило к развитию диуреза и натрийуреза, которые на те же 30-40% превосходили влияние препарата у крыс, пребывавших на свету. В условиях извращения циркадной ритмичности различий в диуретическом и натрийуретическом эффектах фуросемида не выявлялось, т.е. флюктуация действия в зависимости от суточного ритма исчезала. Попутно было выявлено резкое увеличение суточной экскреции  $\text{Na}^+$  у животных, длительное время пребывавших на свету и в условиях извращенных циркадных ритмов. По-видимому, это объясняется стрессовым воздействием длительной световой экспозиции и изменения циркадной ритмичности на экскрецию натрия у ночных животных крыс. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Зафиксированные эффекты, вероятно, обусловлены вовлечением регуляторных возможностей эпифиза и супрахиазматических ядер гипоталамуса посредством дофамина и мелатонина, а также изменением функционирования симпатической системы и оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники.

**Ключевые слова:** функция почек, циркадные ритмы, эффекты фуросемида.

### ABSTRACT

**THE AIM** of the investigation was to analyze the question of possible fluctuation of the effect of diuretics, drugs that are also widely used in cardiologic clinics, depending on the circadian biorhythms in rats. **MATERIAL AND METHODS.** Furosemide was injected intraperitoneally (20 mg/kg) to rats weighing 200-250 g. Effect of the drug following the injection was assessed at 12 pm and at 12 am. Diuresis, excretion of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and creatinine were measured every 6 hours during a day. Then effects of furosemide were investigated in rats, half of which were kept in the dark during 7 hours, and another half – in the light. In the third series of experiments the biorhythms were distorted: the animals were placed in the dark for 12 hours in the daytime, and at night the light was switched on. Part of the animals was given the drug at 12 a.m., the other part – at 12 p.m. **RESULTS.** The rats given the diuretic at noon had the level of diurnal urination about 40%, and excretion of  $\text{Na}^+$  about 30% higher, than in the animals given furosemide at midnight. The growth noted took place at night, since no difference in the action of the drug was observed during the first 6 hours after injection. Injection of furosemide to the rats long kept in the dark resulted in the development of diuresis and natriuresis, that were the same 30-40% higher than the action of the drug in the rats kept in the light. Under conditions of the distorted circadian rhythm no differences in the diuretic and natriuretic effects of furosemide were detected, since the fluctuation depending on the circadian rhythm disappeared. At the same time, sharply increased diurnal excretion of  $\text{Na}^+$  was noted in animals kept in the light over a long period of time and under conditions of distorted biorhythms. It might be explained by stress effects of a continuous exposure to light and of changed circadian rhythms on sodium excretion in nocturnal animals – rats. **CONCLUSION.** The effects observed appear to be due to the involvement of regulatory properties of epiphysis and suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus by means of dopamine and melatonin, as well as to changed formation of the sympathetic system and the hypothalamus-hypophysis-adrenals axis.

**Key words:** kidney function, circadian rhythms, effects of furosemide.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы все больше внимания уделяется проблемам хронобиологии, что, в свою очередь, выявило целый ряд вопросов хронофармакологии и в частности феномен флуктуации фармакологического эффекта в зависимости от биологических ритмов организма. Сегодня хорошо известно, что функционирование сердечно-сосудистой системы подвержено суточным или циркадным, месячным и сезонным колебаниям. А при многих сердечно-сосудистых заболеваниях, например при гипертонической болезни, происходит нарушение этих ритмов. Установлено также, что эффективность целого ряда препаратов, таких как Я-адреноблокаторы, блокаторы кальциевых каналов, ингибиторы АПФ и другие в значительной степени зависит от циркадных колебаний [1]. Нас заинтересовал вопрос о возможной флуктуации эффекта диуретиков, препаратов, которые также широко применяются в кардиологической клинике, в зависимости от суточных ритмов у крыс. При этом мы учитывали, что крысы относятся к животным, ведущим активный ночной образ жизни.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве диуретика был использован фуросемид, который во всех сериях экспериментов вводился внутривенно в дозе 20 мг/кг массы тела. В работе использованы крысы массой от 200 до 250 г, находившиеся в индивидуальных клетках. Мочу собирали в течение суток после введения препарата, измеряя диурез и определяя экскрецию натрия и калия каждые 6 часов. О скорости клубочковой фильтрации судили по экскреции креатинина.

В первой серии экспериментов одной группе животных диуретик вводили в 12 часов дня, второй – в 12 часов ночи. Во второй серии с целью воздействия на циркадные ритмы часть крыс на протяжении 7 суток находилась в условиях постоянной

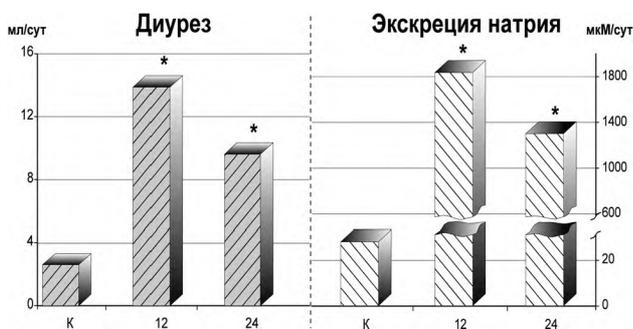


Рис. 1. Влияние фуросемида (20 мг/кг) на диурез и экскрецию натрия у крыс в зависимости от времени введения. По горизонтальной оси: К – контроль, 12 – после введения в 12 часов, 24 – после введения в 24 часа. По вертикальной оси левой части здесь и далее – диурез, мл/сутки, правой части – экскреция Na<sup>+</sup>, мкМ/сутки. Звездочками обозначены достоверные изменения по сравнению с контролем.

темноты, вторая группа в течение такого же времени пребывала в освещенном помещении. В третьей серии экспериментов исследовали эффект фуросемида на фоне извращенных циркадных ритмов у крыс. Для этого была предпринята попытка перед введением диуретика изменить суточную ритмичность, помещая животных во время светового дня в темное помещение на 12 часов, а затем – в ночное время – на такой же период включали дневное освещение. Предварительно до введения фуросемида определяли функцию почек после 7 суток такого извращенного ритма.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Как видно из рис. 1, у крыс, получавших фуросемид в 12 часов дня, уровень суточного мочеотделения был примерно на 40% выше, чем у животных, которым препарат вводили в 12 часов ночи:  $13,9 \pm 1,22$  мл и  $9,6 \pm 0,93$  мл соответственно ( $p < 0,01$ ). Суточная экскреция натрия также была в среднем на 30% выше, составляя соответственно  $1794 \pm 116$  мкМ и  $1334 \pm 165$  мкМ в сутки ( $p < 0,05$ ). Выделение калия и скорость фильтрации существенно не различались.

Во второй серии опытов перед введением фуросемида попутно определяли, не изменяется ли функция почек у животных, длительное время пребывавших в темноте или на свету. Оказалось, что показатели почечной функции у крыс, находившихся в темном помещении, практически не отличались от нормы. Что же касается животных, длительно пребывавших на свету, на фоне нормальных цифр суточного диуреза, экскреции калия и креатинина выявлялось почти 10-кратное увеличение суточного выделения натрия:  $247 \pm 40,6$  мкМ против  $32 \pm 7,0$  мкМ у крыс, находившихся в темном помещении ( $p < 0,001$ ). У интактных животных показатель выделения Na<sup>+</sup> составлял  $28 \pm 2,0$  мкМ в сутки.

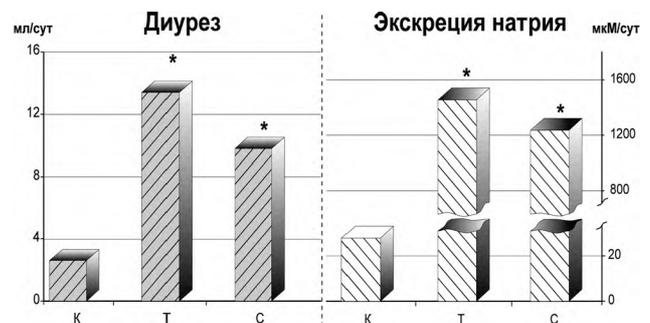


Рис. 2. Влияние фуросемида (20 мг/кг) на диурез и экскрецию натрия у крыс, длительно пребывавших в темноте и на свету. По горизонтальной оси: К – контроль, Т – после пребывания в темноте, С – после пребывания на свету.

Введение фуросемида крысам, длительно находившимся в темном помещении, как следует из рис. 2, приводило к развитию суточного диуретического эффекта, который на те же 35% превосходил влияние препарата у крыс, длительно пребывавших на свету. Так, суточный диурез у первой группы животных возрастал до  $13,4 \pm 1,12$  мл, а у второй – до  $9,8 \pm 0,76$  ( $p < 0,01$ ). Различия в экскреции натрия были не столь выражены, хотя и здесь была зафиксирована четкая тенденция в пользу крыс, продолжительное время существовавших в условиях темноты:  $1451 \pm 111$  мкМ и  $1232 \pm 110$  мкМ соответственно ( $p > 0,5$ ).

Таким образом, оказалось, что эффект диуретика, полученный в условиях продолжительного пребывания крыс в темном помещении, был сопоставим с таковым, наблюдавшимся у интактных крыс при введении фуросемида в 12 часов дня. А действие препарата у крыс, находившихся на свету, было аналогичным эффекту, имевшему место после введения в 12 часов ночи.

В третьей серии опытов в условиях извращенных суточных ритмов выяснилось, что еще до введения фуросемида параметры экскреторной функции почек напоминали таковые у крыс, длительное время пребывавших на свету, т. е. на фоне нормального уровня суточного мочеотделения, экскреции калия и фильтрации выделение натрия было резко повышенным:  $220 \pm 37,7$  мкМ/сут в сравнении с  $28 \pm 2,0$  мкМ/сут у интактных животных ( $p < 0,001$ ).

После пребывания крыс в условиях извращенного суточного ритма первой группе животных вводили фуросемид в 12 часов дня (у крыс – ночь), второй группе – в 12 часов ночи (у крыс – день). Оказалось, что в этих экспериментальных условиях, как видно из рис. 3, различий в диуретическом и натрийуретическом эффектах препарата не выявлялось, т.е. флюктуация действия в зависимости от суточного ритма исчезала. Так, в первой группе крыс суточный диурез после введения диуретика достигал  $10,7 \pm 1,22$  мл, во второй –  $9,3 \pm 1,03$

мл ( $p > 0,5$ ). Соответствующие цифры экскреции натрия составили  $1110 \pm 125$  мкМ и  $1160 \pm 142$  мкМ ( $p > 0,5$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Итак, в первой серии опытов диуретический и натрийуретический эффекты фуросемида при инъекции препарата в 12 часов дня существенно превосходили таковые при введении в полночь. При этом отмеченные различия были настолько очевидными, насколько, на первый взгляд, и странными, учитывая, что крысы – ночные животные, и наибольшая суточная активность присуща им именно в ночные часы [1]. У животных же, длительно находившихся в темном помещении, действие диуретика превосходило выделение воды и натрия у крыс, 7 суток пребывавших на свету. В первом приближении это указывало на наличие определенного несоответствия. К счастью, по ходу опыта мы измеряли мочеотделение каждые 6 часов, что и позволило ответить на возникший вопрос. Анализ показал, что в результате такого мощного воздействия на почки, которое оказывает фуросемид в данной дозе, да еще в условиях внутрибрюшинного введения, все показатели экскреторной функции почек за первые 6 часов были одинаковыми у всех представленных выше групп животных независимо от времени введения или условий содержания в темноте или на свету. Различия же были обусловлены процессами, происходящими в последующие 18 часов. Так что у крыс, получивших диуретик в 12 часов дня, более сильное диуретическое и натрийуретическое действия обеспечивались в период с 18 часов до 12 часов следующего дня, т.е. в основном в ночной период. Соответственно, у животных, которым препарат вводили в 12 часов ночи, различия в эффектах были ограничены рамками временного интервала с 6 утра до 12 часов ночи следующих суток, т.е. главным образом светлым периодом суток. На основании этого мы можем утверждать, что более сильный мочегонный эффект у ночных животных развивается именно в ночное время. И это соответствует результатам, полученным у животных, длительно пребывавших в темном помещении, в сравнении с крысами, продолжительное время находившимися в условиях воздействия дневного света.

Отдельного внимания заслуживает факт резкого повышения экскреции  $\text{Na}^+$  до введения фуросемида у животных, длительно пребывавших в условиях дневного освещения. Объяснить этот факт можно будет после специального изучения. Здесь же отметим, что скорее всего это связано со стрессовым воздействием света и реализуется благо-

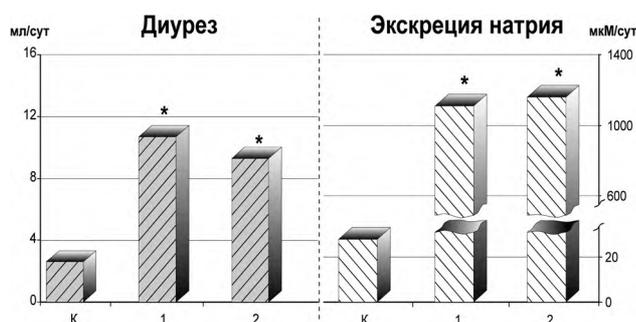


Рис. 3. Влияние фуросемида (20 мг/кг) на диурез и экскрецию натрия у крыс на фоне извращенных циркадных ритмов. По горизонтальной оси: 1 – после введения в 12 часов, 2 – после введения в 24 часа.

даря вовлечению регуляторных возможностей эпифиза и супрахиазматических ядер гипоталамуса через эффекты дофамина и мелатонина и изменение функционирования симпатической нервной системы и оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники. Давно известно, что различные стрессовые воздействия приводят к изменениям функции почек, в том числе – и экскреции  $\text{Na}^+$ . Так, показано, что у людей и крыс влияние таких стрессовых факторов как невесомость и длительное пребывание на холоде существенно увеличивает почечную экскрецию натрия [2-4]. К стрессовым факторам, дезорганизующим циркадную ритмичность у крыс, с полным основанием относят и длительное непрерывное воздействие света [5, 6]. По той же причине, по-видимому, результаты, полученные в третьей серии экспериментов до введения фуросемида, указывают на то, что извращение суточной ритмичности оказывает на почки стрессовое воздействие, аналогичное длительному влиянию света.

Относительно столь значимых различий в силе диуретического и натрийуретического эффектов фуросемида в зависимости от времени введения отметим, что этот факт отмечался ранее в единичных работах японских исследователей [7, 8] и нуждается в дальнейшем изучении. Здесь лишь заметим, что он может быть обусловлен известными изменениями функционирования симпатической нервной системы [9-11] и суточной активности оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники [12-14], что, возможно, и модулирует эффект фуросемида на протяжении суток. Нарушения же циркадной ритмичности, в свою очередь, приводят к ликвидации отмеченных выше различий в действии диуретика.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мочегонное действие фуросемида в условиях однократного внутривенного введения крысам значительно варьирует в зависимости от циркадных ритмов с развитием более сильного эффекта в ночной период времени.

Нарушение или извращение суточных ритмов у крыс нивелирует различия эффектов фуросемида.

Длительное пребывание животных на свету и в условиях извращения суточных ритмов приводит к изменению экскреторной функции почек, выражающемуся в усилении суточного выделения натрия.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Арушанян ЭБ. *Хронофармакология*. Изд. СГМА, Ставрополь, 2000; 357-362
2. Smith DF, de Jong W. Renal lithium, sodium, potassium and water excretion and plasma rennin activity in rats in the cold. *Pharmacopsychiatr Neuropsychopharmacol* 1975; 8 (3): 132-135
3. Macho L, Fickova M, Lichardus B et al. Changes of hormones regulating electrolyte metabolism after space flight and hypokinesia. *Acta Astronaut* 1992; 27: 51-54
4. Wade CE, Morey-Holton E. Alteration of renal function of rats following spaceflight. *Am J Physiol* 1998; 275: R1058-R1065
5. Haupt TA, Moore-Ede MC. Characteristics of food-entrained circadian rhythms in rats during long-term exposure to constant light. *Chronobiol Int* 1990; 7: 383-391
6. Depres-Brummer P, Levi F, Metzger G, Touitou Y. Light-induced suppression of the circadian system. *Am J Physiol* 1995; 268: R1111-R1116
7. Fujimura A, Ohashi K, Ebihara A. Chronotherapeutic study of furosemide in hypertensive subjects: a preliminary report. *Int J Clin Pharmacol Res* 1991; 11 (2): 67-73
8. Fujimura A, Shiga T, Sudoh T et al. Daily variation in the effects of furosemide in rats. *Jpn J Pharmacol* 1992; 60 (4): 323-326
9. Fujimura A, Sudoh T, Shiga T et al. Influence of clorgyline treatment on chronopharmacology of furosemide in rats. *Life Sci* 1993; 52 (9): 819-824
10. Fujimura A, Shiga T, Sudoh T et al. Influence of alpha-receptor blockade on the time-dependent change in the effect of furosemide. *Jpn J Pharmacol* 1993; 62 (4): 403-405
11. Lohmeier TE, Hildebrandt DA, Hood WA. Renal nerves promote sodium excretion during long-term increases in salt intake. *Hypertension* 1999; 33 (1): 487-492
12. Heuser I, Deuschle M, Weber A et al. The role of mineralocorticoid receptors in the circadian activity of the human hypothalamus-pituitary-adrenal system: effect of age. *Neurobiol Aging* 2000; 21 (4): 585-589
13. Heuser I, Deuschle M, Weber A et al. Increased activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system after treatment with the mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone. *Psychoneuroendocrinology* 2000; 25 (5): 513-518
14. de Kloet ER. Hormones, brain and stress. *Endor Regul* 2003; 37 (2): 51-68

Поступила в редакцию 21.01.2006 г.