

© И.В.Смирнов, А.А.Бондарев, В.М.Брюханов, Я.Ф.Зверев, 2011
УДК 615.254-092.4

И.В. Смирнов¹, А.А. Бондарев¹, В.М. Брюханов¹, Я.Ф. Зверев¹

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ «ДОЗА–ЭФФЕКТ» ДЛЯ ФУРОСЕМИДА У КРЫС

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

PATTERNS OF THE «DOSE-EFFECT» RELATIONSHIP FOR FUROSEMIDE AT RATS

¹Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Выявить возможную зависимость фармакологического влияния фуросемида на функцию почек у крыс от различных доз диуретика с построением кривой зависимости «доза–эффект». **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Исследование проведено на крысах-самцах Wistar. Определяли суточные показатели мочеотделения и экскреции электролитов после однократного подкожного введения фуросемида в дозах 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 мг/кг. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** В диапазоне доз фуросемида от 1 до 2 мг/кг наблюдался первый порог кривой насыщения в отношении экскреции натрия, для выделения калия порог насыщения фиксировался при применении дозы диуретика 2 мг/кг. Это позволяет предположить, что образование комплексов фуросемида с НКСС происходит в интервале доз 1–2 мг/кг. В области от 2 до 5 мг/кг регистрировалось насыщение транспортеров для экскреции калия при сохранении линейной зависимости прироста экскреции натрия. В диапазоне от 5 до 20 мг/кг наблюдалось последовательное увеличение экскреции натрия и хлора при неизменном уровне экскреции калия. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Анализ полученных данных зависимости «доза–эффект» позволил выявить ряд закономерностей диуретической и салуретической активности фуросемида у крыс. Экскреция ионов натрия достигает первого порога насыщения при дозировках фуросемида от 0,5 до 2 мг/кг, затем в области высоких доз наблюдается дальнейшее медленное нарастание выделения этих ионов. Зависимость экскреции ионов калия от дозы фуросемида отличается от экскреции натрия. Кривая имеет один порог насыщения, которое достигается в области доз от 1,5 до 5,0 мг/кг, а в области более высоких доз экскреция ионов калия остается неизменной. Экскреция ионов хлора пропорциональна суммарной экскреции ионов калия и натрия, что характерно для всего семейства катион-хлорных транспортеров, осуществляющих электронеutralный транспорт.

Ключевые слова: фуросемид, экскреция электролитов, катион-хлорные транспортеры.

ABSTRACT

THE AIM. To detect possible relationship of furosemide pharmacological effect on kidneys function at rats from different diuretic doses with “dose-effect” response graphing. **MATERIAL AND METHODS.** The research was done at male Wistar rats. Daily factors of urinary passage and electrolyte excretion were determined after single subcutaneous injection of furosemide with doses 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 mg/kg. **RESULTS.** It provides suggestions that furosemide complexing with NKCC happens in the range of 1-2 mg/kg doses. Saturation of potassium excretion transfers was registered in the range from 2 to 5 mg/kg on retention of sodium excretion increment linearity. In a range from 5 to 20 mg/kg sequential sodium and chlorine excretion increase was observed at invariable potassium excretion level. **CONCLUSION.** “Dose-effect” dependence received data analysis allowed to reveal a number of furosemide diuretic and saluretic activity laws. Sodium ions excretion reaches first saturation threshold at furosemide doses from 0,5 to 2 mg/kg, then at high doses further slow allocation increase of these ions is observed. Potassium ions excretion dependence of furosemide dose differs from sodium excretion. The curve has one saturation threshold, which is reached at doses from 1,5 to 5,0 mg/kg, and at higher doses potassium ions excretion is invariable. Chloride ions excretion is proportional to total potassium and sodium ions excretion tellingly to all cation-chlorine transporters series which are carrying out electroneutral transport.

Key words: furosemide, electrolytes excretion, cation-chlorine transporters.

ВВЕДЕНИЕ

При взаимодействии лекарственного вещества (ЛВ) с его биологической мишенью (БМ), в основе которого лежит межмолекулярное взаимодей-

ствие, важным оценочным параметром является константа прочности комплекса ЛВ–БМ. Эта величина позволяет оценить меру аффинитета лиганда к основной и побочным мишеням [1]. В живом организме произвести оценку прочности межмолекулярного комплекса можно только по величине наблюдаемых биологических эффектов, которые

Смирнов И.В. 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, д. 40. Алтайский государственный медицинский университет, кафедра фармакологии. Тел.: (3852) 260829; E-mail: ivan.vl.smirnov@gmail.com

возникают при взаимодействии ЛВ с БМ, основным характеризующим параметром которого является кривая насыщения лигандом потенциальной биологической мишени [2].

Известно, что основными биологическими мишенями фуросемида, одного из наиболее распространенных в клинической практике диуретических средств, являются катион-хлорные транспортеры NCC, NKCC и KCC [3, 4]. Эти белки осуществляют электронеutralный транспорт ионов натрия, калия и хлора через клеточную мембрану, являясь важным звеном в регуляции водно-солевого гомеостаза организма [5].

Целью данной работы была оценка наблюдаемых фармакологических эффектов со стороны функции почек при введении различных доз фуросемида и построение кривой зависимости «доза–эффект», которая в данном случае является кривой насыщения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в осенний период на крысах-самцах Wistar массой 220–250 г, которых содержали на стандартной диете в естественном световом режиме. Животные находились в индивидуальных клетках, приспособленных для сбора мочи. В контроле крысам однократно подкожно вводили 1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Фуросемид вводили подкожно в 1 мл физиологического раствора последовательно в дозах 0,5, 1, 2, 5, 10, 20 мг/кг. Производили сбор суточной мочи, измеряя величину диуреза, экскрецию ионов натрия, калия, хлора и клубочковую фильтрацию, о величине которой судили по выделению с мочой креатинина. После введения очередной дозы фуросемида животные выдерживались в клетках вплоть до возвращения оцениваемых показателей до контрольных величин. В таком ритме все 6 доз фуросемида были введены в течение 2 мес эксперимента. Концентрацию ионов натрия и калия в моче определяли методом пламенной фотометрии на фотометре ПАЖ-3. Концентрацию ионов хлора детектировали с помощью набора реагентов «ХЛОРИДЫ-ВИТАЛ», креатинина – с использованием набора реагентов «КРЕАТИНИН-12-ВИТАЛ», методом, основанным на реакции Яффе с депротеинизацией. 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 применением параметрического критерия Стью-

дента. Анализ данных выполнен с использованием программы Biostat для Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основные результаты исследования влияния различных доз фуросемида на функцию почек у крыс приведены в таблице. Следует отметить, что фуросемид в диапазоне от 0,5 до 20 мг/кг не вызывал существенных изменений экскреции эндогенного креатинина. Все полученные изменения по отношению к фону были не достоверны, что свидетельствовало о незначительном влиянии препарата на скорость клубочковой фильтрации. Следовательно, наблюдаемые изменения диуреза и экскреции ионов были обусловлены исключительно влиянием препарата на системы транспорта ионов в канальцах почек.

Из таблицы видно, что увеличение дозы фуросемида приводило к последовательному росту

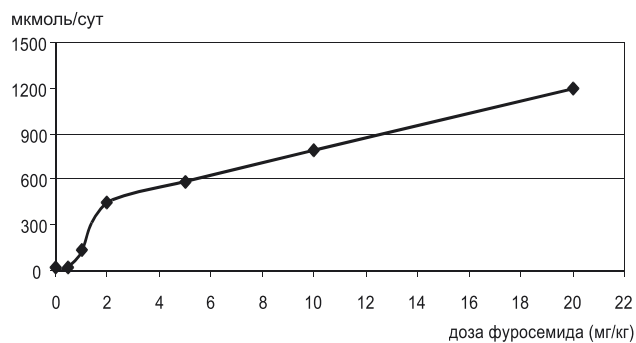


Рис. 1. Суточная экскреция ионов натрия.

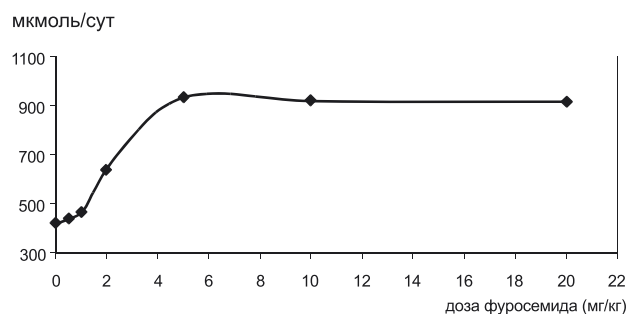


Рис. 2. Суточная экскреция ионов калия.

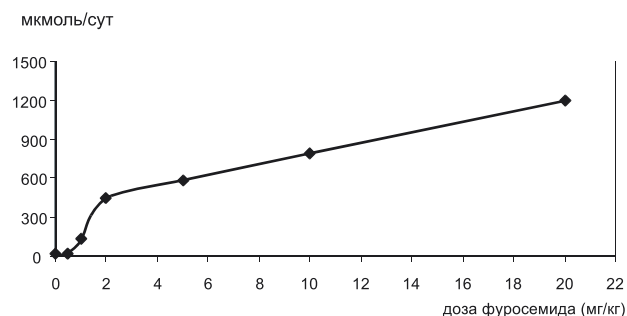


Рис. 3. Суточная экскреция ионов хлора.

Влияние нарастающих доз фуросемида на экскреторную функцию почек крыс ($\bar{X} \pm m$)

Доза фуросемида, мг/кг	Показатели функции почек				
	Диурез, мл/сут	Экскреция, ммоль/сут			
		Натрий	Калий	Хлор	Креатинин
Контроль	6,2±0,9	17±2,5	423±42,8	169±16,9	41±5,1
0,5	7,1±0,9	26±3,7	446±39,0	181±16,6	48±4,4
1	8,1±0,9	140±26,6*	468±42,3	348±22,8*	56±5,9
2	14,4±1,7*	443±51,6*	640±59,7*	741±59,0*	49±6,8
5	18,6±1,7*	588±59,0*	937±87,6*	922±60,8*	50±3,9
10	18,0±1,6*	796±87,5*	923±79,5*	1150±101,8*	54±4,6
20	19,3±1,7*	1197±101,7*	915±106,0*	1454±112,6*	53,9±6,4

* Достоверные отличия от контрольных показателей, $p < 0,001$.

суточного мочеотделения, достигавшему достоверных значений при введении 2 мг/кг препарата, после чего диурез стабилизировался на одном уровне в диапазоне доз от 5 до 20 мг/кг. Для экскреции натрия была характерна последовательная динамика рост с пороговым «скачком» в диапазоне 1–2 мг/кг, что наглядно иллюстрирует рис. 1. Сходная динамика выявлялась и в отношении экскреции хлора, как это следует из данных, представленных на рис. 2. Выделение калия из организма, как это видно из рис. 3, практически не изменялось вплоть до применения дозы фуросемида 2 мг/кг. Затем в диапазоне доз от 2 до 5 мг/кг наблюдался скачкообразный прирост экскреции этого иона со стабилизацией на одном уровне независимо от дальнейшего увеличения дозы препарата (см. таблицу).

ОБСУЖДЕНИЕ

Совместный анализ зависимостей экскреции ионов натрия и калия позволяет предположительно оценить аффинитет молекулы фуросемида к различным представителям семейства катион-хлорных транспортеров, а именно, NKCC, KCC и NCC. Исследование показало, что при дозировках от 1 до 2 мг/кг наблюдается четко выраженный первый порог кривой насыщения для экскреции ионов натрия. Применение 2 мг/кг фуросемида обусловило также резкое повышение выделения ионов калия. По-видимому, в диапазоне доз от 1 до 2 мг/кг преимущественно происходит образование комплексов молекул фуросемида с натрий-калий хлорными котранспортерами (NKCC).

В интервале доз от 2 до 5 мг/кг наблюдался эффект, свидетельствующий о насыщении процесса экскреции ионов калия, в то время как для показателя экскреции натрия в этом диапазоне взаимоотношение «доза–эффект» имело четко выраженную линейную зависимость. Это позволяет предположить, что в отмеченном интервале доз происходит преимущественно образование комп-

лексов молекул фуросемида с калий-хлорными котранспортерами (KCC).

В диапазоне высоких доз фуросемида от 5 до 20 мг/кг было зафиксировано последовательное увеличение экскреции ионов натрия при неизменном уровне выделения калия. В отношении выделения натрия не исключено, что здесь располагается начальный участок следующего порога на-

сыщения, который находится в области более высоких доз. Экскреция ионов хлора здесь также характеризовалась поступательным нарастанием. По всей вероятности, в области высоких доз молекулы фуросемида в основном образуют комплексы с биологической подсистемой, ответственной за совместный транспорт ионов натрия и хлора, какой являются натрий-хлорные котранспортеры (NCC).

Важную информацию о константах прочности комплексов молекулы фуросемида также несет область доз, при которой мы фиксировали кривую насыщения: для комплекса фуросемид-NKCC – это предположительно от 0,5 до 2 мг/кг; для комплекса фуросемид-KCC – от 1,5 до 5 мг/кг. Для комплекса фуросемид-NCC, по-видимому, интервал максимального комплексообразования начинается с 5 мг/кг, а насыщение достигается при концентрациях, превышающих 20 мг/кг. Близость интервалов комплексообразования для NKCC и KCC свидетельствует о том, что аффинитет фуросемида, т.е. константы прочности образуемых комплексов, очень близки и имеют гораздо более высокие значения, чем константа прочности комплекса фуросемида с натрий-хлорным котранспортером (NCC).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ полученных данных зависимости «доза–эффект» позволил выявить ряд закономерностей диуретической и салуретической активности фуросемида у крыс. Экскреция ионов натрия достигает первого порога насыщения при дозировках фуросемида от 0,5 до 2 мг/кг, затем в области высоких доз наблюдается дальнейшее медленное нарастание выделения этих ионов. Зависимость экскреции ионов калия от дозы фуросемида отличается от экскреции натрия. Кривая имеет один порог насыщения, которое достигается в области доз от 1,5 до 5,0 мг/кг, а в области более высоких доз экскреция ионов калия остается неизменной. Экскреция ионов хлора пропорциональна

суммарной экскреции ионов калия и натрия, что характерно для всего семейства катион-хлорных транспортеров, осуществляющих электронейтральный транспорт.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. 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
2. Брюханов ВМ, Смирнов ИВ, Бондарев АА, и др. Экс-

периментальное и теоретическое изучение механизма диуретической активности фуросемида. *Психофармакология и биологическая наркология* 2007; (7): 1953

3. Gagnon E, Bergenon MJ, Brunet GM, et al. Molecular Mechanism of Cl-transport by the renal Na+K+Cl-cotransporter. *J Biol Chem* 2004; 297 (7): 5648-5654

4. Mount DB, Delpire E, Gamba G, et al. The electroneutral cation-chloride cotransporters. *J Experim Biol* 1998; 201: 2091-2102

5. Зверев ЯФ, Брюханов ВМ. *Фармакология и клиническое использование экстраренального действия диуретиков*. Медицинская книга, М., 2000; 256

Поступила в редакцию 14.02.2011 г.

Принята в печать 18.11.2011 г.