

© О.С.Рытикова, В.М.Брюханов, Я.Ф.Зверев, И.Е.Госсен, 2005
УДК 616.613-005.4-08.761].001.5

О.С.Рытикова, В.М.Брюханов, Я.Ф.Зверев, И.Е.Госсен

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУРОСЕМИДА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ПОЧЕК

O.S.Rytikova, V.M.Bryukhanov, Ya.F.Zverev, I.E.Gossen

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF FUROSEMID UNDER CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ISCHEMIA OF THE KIDNEYS

Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучить влияние фуросемида на показатели оксидантного и антиоксидантного статусов почки в условиях острой экспериментальной ишемии. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Ишемию почки вызывали у крыс перевязкой левой почечной артерии на 4 часа. Фуросемид в дозе 20 мг/кг вводили внутривенно за 1, 3 и 10 часов до ишемии. Определяли общую оксидантную активность и тиобарбитуратчувствительные продукты перекисного окисления липидов. Антиоксидантный статус оценивали по изменению показателей общей антиоксидантной активности (ОАА), а также активности антиоксидантных ферментов каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). **РЕЗУЛЬТАТЫ.** В экспериментах *in vivo* установлено, что при введении фуросемида показатели оксидантного статуса практически не отличались от таковых у контрольных животных на фоне четырехчасовой ишемии. Показатели антиоксидантной активности, напротив, существенно изменялись под влиянием диуретика. Если в контрольных опытах резкий рост уровня свободных радикалов в условиях ишемии активировал в почках антиоксидантную систему, предварительное введение фуросемида предотвращало активацию ОАА в ишемизированных почках. Максимальный эффект отмечался при введении диуретика за 10 часов до ишемии. Активность каталазы коррелировала с изменениями активности ОАА. Изменения активности СОД и ГПО были менее выражены. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, в прямых опытах с экспериментальной острой ишемией почки показано, что фуросемид повышает устойчивость почечной ткани к гипоксии, предотвращая активацию антиоксидантной системы. Вполне возможно, что способность диуретика угнетать интенсивность процессов свободнорадикального окисления вносит вклад в защиту почки от ишемического повреждения.

Ключевые слова: экспериментальная ишемия почки, свободнорадикальное окисление, фуросемид.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study effects of furosemid on the indices of oxidant and antioxidant statuses of the kidney under conditions of acute experimental ischemia. **MATERIAL AND METHODS.** Ischemia of the kidney was caused in rats by ligation of the left renal artery for 4 hours. Furosemid (20 mg/kg) was injected intraperitoneally 1, 3 and 10 hours before ischemia. Total oxidant activity and thiobarbiturate sensitive products of lipid peroxidation were determined. The antioxidant status was estimated by changes of the indices of total antioxidant activity (TAA) and by activity of antioxidant enzymes - catalase, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPO). **RESULTS.** Experiments *in vivo* have shown that after injection of furosemide the oxidant status indices did not practically differ from those in control animals against the background of four hour long ischemia. In contrast, the antioxidant activity indices were substantially changed under the influence of the diuretic. If in control experiments the dramatic growth of the radical level in ischemia activated the antioxidant system in the kidneys, the preliminary injection of furosemide prevented activation of TAA in ischemic kidneys. The maximal effect was noted after injection of the diuretic 10 hours before ischemia. The catalase activity correlated with the changes of TAA activity. Changes of activity of SOD and GPO were less pronounced. **CONCLUSION.** In direct experiments with experimental acute ischemia of the kidney it was shown that furosemid increased the resistance of the renal tissue to hypoxia thus preventing activation of the antioxidant system. It is fairly possible that the ability of the diuretic to suppress the intensity of processes of free radical oxidation is a good contribution to prevent an ischemic lesion of the kidney.

Key words: experimental ischemia of the kidney, free radical oxidation, furosemid.

ВВЕДЕНИЕ

Ишемия органов сопровождается многие патологические состояния. В связи с этим профилактика и лечение ишемических поражений представляет большой интерес. Значительное число работ посвящено защите от ишемии миокарда и головного мозга. Между тем, ишемия почек – также явление нередкое, возникающее при недостаточности кровообращения почек или единственно функционирующей почки. Зачастую ишемические повреждения почек приводят к развитию

ОПН. Несмотря на современные подходы к лечению, включая гемодиализ и хирургические методы, смертность от данной патологии остается высокой.

В настоящее время при ишемии почек успешно применяют хирургические методы лечения. Восстановление кровообращения почек с помощью реконструкции почечной артерии или эндоваскулярной ангиопластики, по оценкам клиницистов, занимает центральное место в лечении больных с ишемической болезнью почек и дает хорошие результаты [1].

Несмотря на большие достижения в данной области, возможности профилактики и консервативной терапии данной патологии изучены мало.

В то же время, ряд авторов отмечает, что превентивное введение некоторых препаратов, в том числе и диуретиков, таких как фуросемид, этакриновая кислота и маннит, предохраняет почку от ишемического повреждения или ослабляет его [2–5].

Как принято считать, одним из вероятных механизмов противоишемического действия диуретиков является выраженный сдвиг в гидродинамике нефрона. Одна из причин этого сдвига – значительное подавление реабсорбции натрия, связанное с блокадой энергетических процессов, обеспечивающих транспорт иона в каналах. Угнетение окислительного метаболизма в почечном эпителии приводит к уменьшению потребления энергии и кислорода и повышению выносимости почечной ткани к гипоксии [2, 3, 4]. Не исключено поэтому, что в противоишемическом действии диуретиков в связи с угнетением процессов реабсорбции в нефронах и снижением потребления кислорода определенную роль играют возникающие изменения гемодинамики [2, 6].

Наряду с этим, учитывая, что в развитии ишемии, как показано нами ранее, существенную роль играют процессы свободнорадикального окисления [7], возникло предположение, что защитное действие диуретиков при ишемии может быть связано с изменением активности антиоксидантной системы клетки, либо с влиянием на уровень свободных радикалов в ишемизированной ткани.

Одним из диуретиков, на защитное действие которого при ишемии указывают авторы, является фуросемид. В связи с этим, целью данного исследования стало изучение влияния фуросемида на свободнорадикальное окисление в почке при экспериментальной ишемии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами была использована разработанная в нашей лаборатории модель острой экспериментальной ишемии почки. Данная модель позволяет оценить активность оксидантной и антиоксидантной систем в почечной ткани при ишемии почек небольшой продолжительности [7].

Опыты *in vivo* по изучению возможных антиоксидантных свойств фуросемида проводили на беспородных крысах-самцах. Для эксперимента брали три группы животных. Фуросемид вводили внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг за 1 час до перевязки левой почечной артерии в первой группе животных, за 3 часа – во второй и за 10 часов – в третьей. Влияние диуретика на процессы свободнорадикального окис-

ления изучали на фоне четырехчасовой ишемии, так как, согласно нашей модели экспериментальной ишемии почек, максимальные изменения в оксидантном и антиоксидантном статусах возникают через четыре часа после перевязки артерии.

Процесс свободно радикального окисления оценивали как единство оксидантной и антиоксидантной систем. Для исследования брали обе почки, в гомогенате которых определяли изменения показателей оксидантного статуса. Общую оксидантную активность (ООА) – суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободно радикальных метаболитов – оценивали по накоплению в ткани почек продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Для оценки оксидантного статуса определяли также концентрацию малонового диальдегида (МДА) и других тиобарбитурчувствительных продуктов (ТБРП), образующихся в ходе реакций ПОЛ.

Антиоксидантную активность в гомогенате почек оценивали по изменению интегративного показателя антиоксидантной активности (ОАА) и активности антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (КАТ), глутатионпероксидазы (ГПО). ОАА определяли по степени ингибирования Fe^{2+} /аскорбат-индуцированного окисления ТВИН-80 гомогенатом ткани. Активность КАТ определяли по содержанию цветных комплексов молибдата натрия с перекисью водорода. Активность СОД – по реакции восстановления нитротетразолия супероксидными радикалами. Маркером активности ГПО служило определение неокисленного глутатиона по цветной реакции с реактивом Элмана.

Предварительно влияние фуросемида на процессы свободно радикального окисления изучались в опытах *in vitro*, для чего определяли изменения ООА и ОАА под действием раствора диуретика, внесенного в модельные системы.

Результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов Стьюдента и сравнивали их с данными, полученными при четырехчасовой ишемии без введения фуросемида.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение влияния фуросемида на процессы свободно радикального окисления *in vitro* показало, что в этих условиях фуросемид подавляет железо-аскорбат/зависимое окисление ТВИН-80, что снижает накопление МДА на 45%. В то же время в опытах *in vitro* фуросемид стимулировал и оксидантную активность.

В экспериментах *in vivo* установлено, что при

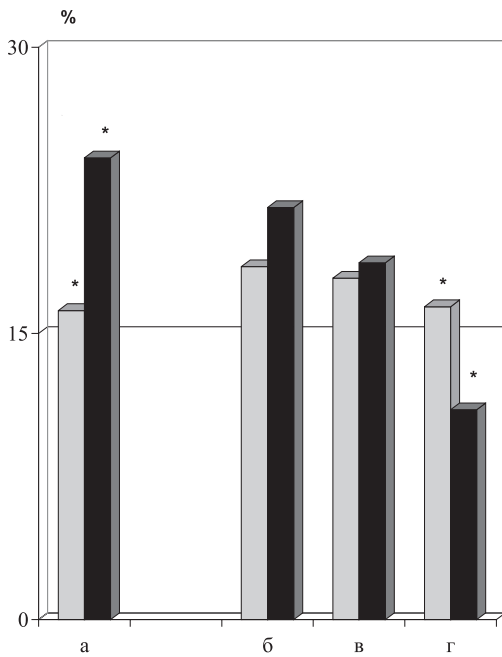


Рис. 1. Влияние фуросемида на активность ОАА в условиях четырехчасовой ишемии. По горизонтальной оси: а – без введения фуросемида; б, в, г – при введении фуросемида за 1, 3 и 10 часов до ишемии соответственно. По вертикальной оси – активность ОАА в %. Звездочками отмечены достоверные различия между ишемизированной и контралатеральной почками. Светлые столбики – показатели контралатеральной почки. Темные столбики – показатели ишемизированной почки.

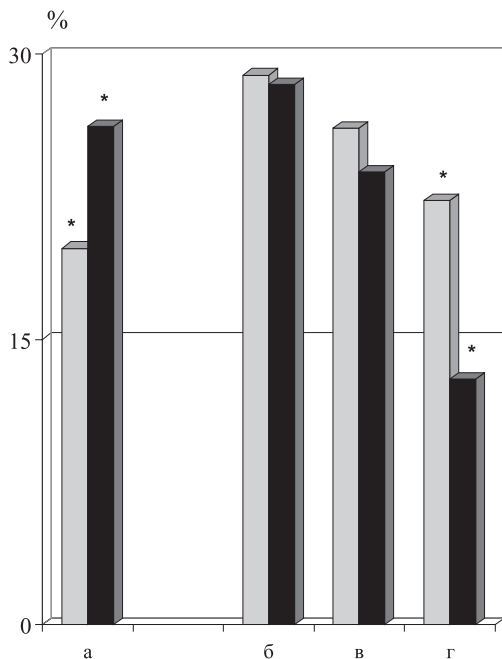


Рис. 2. Влияние фуросемида на активность каталазы в условиях четырехчасовой ишемии. По горизонтальной оси: а – без введения фуросемида; б, в, г – при введении фуросемида за 1, 3 и 10 часов до ишемии соответственно. По вертикальной оси – активность каталазы в %. Звездочками отмечены достоверные различия между ишемизированной и контралатеральной почками. Светлые столбики – показатели контралатеральной почки. Темные столбики – показатели ишемизированной почки.

введении фуросемида показатели оксидантного статуса во всех трех группах животных не изменялись. Как в экспериментальной почке, так и в интактной,

концентрация МДА и других тиобарбитурчувствительных продуктов перекисного окисления липидов, а также комплексный показатель ООА соответствовали значениям у животных при четырехчасовой ишемии без введения фуросемида.

В антиоксидантной активности, напротив, отмечались существенные изменения.

Как видно из рис. 1, если через четыре часа перевязки почечной артерии без введения диуретика в ишемизированных почках наблюдался рост активности ОАА, то введение фуросемида за 1 час до эксперимента практически устраняло разницу в значениях ОАА между интактной и экспериментальной почками. Из того же рисунка следует, что аналогичные изменения общей антиоксидантной активности отмечались и при введении фуросемида за 3 часа до перевязки артерии. Максимальные же изменения ОАА отмечались при введении фуросемида за 10 часов до эксперимента. При этом общая антиоксидантная активность в ишемизированной почке составила 11%, что соответствует значениям ОАА в почках у интактных животных. Активность ОАА в контралатеральных почках оказалась даже выше и составила 16,4%

Выяснилось, что активность интегративного показателя антиоксидантной активности ОАА коррелирует с изменениями активности основного фермента антиоксидантной защиты клеток каталазы. Если в ишемизированной почке без введения диуретика активность этого фермента существенно превосходила таковую в контралатеральной почке, то в условиях применения фуросемида за 1 и 3 часа до ишемии показатели активности КАТ в обеих сравниваемых почках существенно не различались. А при введении фуросемида за 10 часов до ишемии рост активности КАТ в почке, подвергнутой ишемии, вообще предотвращался и становился ниже, чем в контралатеральной, не отличаясь от показателей в интактных органах (рис. 2).

Не отмечено существенных изменений в активности СОД и ГПО при введении фуросемида за 1 час и за 3 часа до экспериментальной ишемии. При введении фуросемида за 10 часов до перевязки левой почечной артерии активность ГПО и СОД сохранялась на высоком уровне в обеих почках.

ОБСУЖДЕНИЕ

Опыты *in vitro* указывают на способность фуросемида прямо воздействовать как на оксидантную активность, так и на антиоксидантный статус.

Как выяснено нами ранее, максимальная активация процессов свободно радикального окисле-

ния, отмечавшаяся через четыре часа эксперимента, связана с оксидативным стрессом, вызванным жесткими условиями ишемии. При этом уровень МДА в ишемизированных почках почти в четыре раза превышал значения в интактных. Оказалось, что накопление свободных радикалов в ткани почек в течение четырех часов ишемии стимулирует активность антиоксидантной системы. Наиболее активно в процесс нейтрализации свободных радикалов вступает каталаза (КАТ). При ишемии активность каталазы возрастала до 26%, тогда как в почках здоровых животных составляла 11%. Так что наблюдавшийся рост активности интегративного показателя ОАА через четыре часа ишемии, вероятно, связан главным образом с активацией каталазы [7].

Эксперименты на животных показали, что фуросемид не влияет на оксидантный статус ишемизированных почек. В антиоксидантном статусе, напротив, отмечены существенные изменения. Как было установлено ранее, ишемия вызывает рост свободных радикалов и ответную активацию антиоксидантной системы. При введении же фуросемида за 1 час и за 3 часа до перевязки почечной артерии не отмечалось существенных изменений в антиоксидантном статусе ишемизированных почек, указывающих на борьбу клеток с оксидативным стрессом, индуцированным четырехчасовой ишемией. Таким образом, предварительное введение фуросемида за 1 час и за 3 часа до начала ишемии предотвращало рост антиоксидантной активности в экспериментальной почке и повышало устойчивость почечной ткани к гипоксии. Защитное действие фуросемида на ишемизированную почку становилось еще более очевидным при введении диуретика за 10 часов до экспериментальной ишемии. При этом несмотря на высокий уровень свободных радикалов в ишемизированной ткани, ОАА и активность КАТ экспериментальных почек соответствовали значениям здоровых животных. Следует отметить, что защитный эффект фуросемида при ишемии был более выражен при увеличении времени воздействия диуретика на почечную ткань. Изменения интегративного показателя антиоксидантной активности, очевидно, связано с изменением активности основного фермента антиоксидантной защиты каталазы, что подтверждается строгой корреляцией изменений ОАА и КАТ.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что фуросемид обладает антиоксидантной активностью, и позволяют предположить несколько возможных механизмов этого действия.

Как известно, каталаза является основным ферментом антиоксидантной защиты клеток и спо-

собна своевременно нейтрализовать перекись водорода даже при значительной активации процессов ПОЛ [8, 9]. Высокое содержание каталазы обнаружено в почках, где фермент локализуется преимущественно в пероксисомах клеток. Активация каталазы при четырехчасовой ишемии без введения фуросемида, по-видимому, связана не только с изменением активности свободного фермента, но и с выходом из пероксисом вследствие повреждения мембран свободными радикалами. Не исключено, что фуросемид, стабилизируя мембраны субклеточных структур, предотвращает выход каталазы из депо в цитозоль, что создает резерв для дальнейшей борьбы клеток с оксидативным стрессом.

С другой стороны, если каталаза пероксисом не выполняет свою функцию, в ишемизированной почке следует ожидать рост концентрации свободных радикалов. Однако в условиях применения диуретика этого не происходило. Объяснить это можно тем, что фуросемид способен прямо блокировать процессы перекисного окисления, инициированного воздействием ишемического фактора. На модели тотальной ишемии *in vitro* была показана принципиальная возможность фуросемида ингибировать накопление МДА в почках при ишемии [5]. Антиоксидантная активность диуретика в условиях *in vitro* была подтверждена и нами. Наличие у фуросемида антиоксидантных свойств может являться основой для формирования концепции молекулярного механизма защитного действия диуретика при ишемическом повреждении. Присутствие в молекуле фуросемида циклической структуры и двойных связей не исключает возможности его непосредственного участия в инактивации свободных радикалов.

Вполне вероятно также, что влияние фуросемида на процессы свободно радикального окисления связано с угнетением окислительного фосфорилирования митохондрий. Хорошо известна роль электронно-транспортных цепей митохондрий в индукции активных форм кислорода (АФК) и инициировании перекисного окисления [10]. Скорость образования АФК находится в прямой зависимости от степени сопряжения дыхательной цепи митохондрий. Резкое падение парциального давления кислорода при ишемии приводит к блокаде дыхательной цепи и значительной «утечке» электронов вследствие восстановления переносчиков на предшествующих блокаде участках. Экспериментально доказана способность фуросемида угнетать перенос электронов по дыхательной цепи митохондрий, что может препятствовать накоплению АФК в клетке и ингибировать процессы свободноради-

кального окисления, индуцированные последующей ишемией [2, 4]. Не исключено, что в обеспечении антиоксидантного эффекта фуросемида играют роль один или несколько из предполагаемых механизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в прямых экспериментах с экспериментальной ишемией почки, а также в опытах *in vitro*, показано, что фуросемид обладает антиоксидантным действием. Вполне возможно, что способность диуретика угнетать интенсивность процессов свободнорадикального окисления вносит свой вклад в защиту почки от ишемического повреждения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Игнатов АМ, Смирнов АВ, Добронравов ВА и др. Ишемическая болезнь почек. *Нефрология* 2004; 2: 19-27

2. Лебедев АА, Дубищев АВ. *Клиническая фармакология диуретиков*. Издательство КМИ, Куйбышев, 1985

3. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф. Побочные эффекты современных диуретиков. Новосибирск: ЦЭРИС; 2003.

4. Дубищев АВ. О механизме противоишемической защиты почек диуретиками. *Фармакол и токсикол* 1991; 4: 76-79

5. Лебедев АА, Петренко НА. Антиокислительные свойства фуросемида в условиях ишемии почки. *Эксперим и клин фармакол* 1996; 4: 28-30

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

7. Рытикова ОС, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ, Госсен ИЕ. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе непродолжительной ишемии почки в эксперименте. *Нефрология* 2004; 4: 115-116

8. Владимиров ЮА, Арчаков АИ. *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*. Наука, М, 1972

9. Шанин ЮН, Шанин ВЮ, Зиновьев ЕВ. *Антиоксидантная терапия в клинической практике*. ЭПБИ-СПб, СПб, 2003

10. Биленко МВ. *Ишемические и реперфузионные повреждения органов*. Медицина, М, 1989

Поступила в редакцию 03.12.2004 г.