

## РОЛЬ НАДПОЧЕЧНИКОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ СУТОЧНЫХ КОЛЕБАНИЙ МОЧЕГОННОГО ЭФФЕКТА ФУРОСЕМИДА У КРЫС

Валерий Михайлович БРЮХАНОВ, Анна Яковлевна ЗВЕРЕВА

ГБОУ ВПО Алтайский государственный медицинский университет Минздрава России  
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

Целью работы явилось выяснение роли надпочечников в обеспечении выявленных ранее циркадианных колебаний диуретической активности фуросемида в зависимости от времени его введения крысам. Сравнивали эффект фуросемида у ложнооперированных и адреналэктомированных животных. Диуретик вводили внутривентрально в дозе 20 мг/кг массы тела в 12<sup>00</sup> и в 24<sup>00</sup>. Через 6 и 24 часа после инъекции измеряли диурез, определяли содержание Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, креатинина, а также фуросемида. Введение фуросемида приводило к быстрому развитию мочегонного действия, сохранявшегося на протяжении суток, существенному росту выделения натрия и калия, увеличению суточной экскреции креатинина. Установлено, что у контрольных (ложнооперированных) крыс на фоне сопоставимого выделения диуретика с мочой влияние фуросемида на экскреторную функцию почек, особенно в первые часы, более выражено после введения в ночное время. В условиях адреналэктомии отмеченное различие сохранялось лишь в виде тенденции. Сделан вывод, согласно которому надпочечники вносят определенный вклад в обеспечение суточных колебаний эффекта фуросемида у крыс.

**Ключевые слова:** фуросемид, функция почек, суточные колебания, адреналэктомия.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что влияние петлевого диуретика фуросемида на функцию почек у крыс подвержено существенным циркадианным колебаниям. Это проявляется значительными различиями в выраженности диуретического и натрийуретического эффектов после введения препарата в дневные и ночные часы [1]. В последние годы установлено, что подобные колебания в большой степени определяются центральным и периферическими водителями биоритмов, обеспечивающими функциональную активность организма в те или иные периоды суток. Центральный пейсмейкер локализован в супрахиазматических ядрах гипоталамуса (СХЯ), имеет ряд афферентных входов, благодаря чему получает информацию о состоянии окружающей среды, а через эфферентные выходы управляет физиологическими ритмами. При этом важнейшую роль играет синхронизация функционального состояния организма с циклом «день – ночь». Одновременно существенный вклад в синхронизацию биоритмов вносят периферические осцилляторы, координирующие функционирование внутренних органов с сигналами центрального пейсмейкера [2]. Особую роль в отмеченном процессе синхронизации, по-видимому, играют гормоны коры надпочечников, синтез и выделение кото-

рых также подвержены суточным колебаниям [3–5]. Установлено, что локализованный в надпочечниках периферический пейсмейкер связан с центральным водителем ритма как через гипоталамную секрецию адренокортикотропного гормона, так и с помощью не так давно идентифицированного нейронального пути между СХЯ и надпочечниками [6].

Учитывая важную роль гормонов надпочечников в обеспечении экскреторной функции почек, возникло закономерное предположение о возможной связи между циркадианными колебаниями в эффектах фуросемида и функцией надпочечников.

Целью настоящей работы явилось сравнение суточных колебаний в действии фуросемида относительно экскреторной функции почек у контрольных (ложнооперированных) и адреналэктомированных крыс.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 40 сертифицированных самцах крыс Wistar массой 200–220 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН в летне-осенний период, соответствующий световому режиму юга Западной Сибири (по 12 часов светлого и темного времени). Животные были разделены на

Брюханов В.М. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии, ректор,  
e-mail: rector@asmu.ru

Зверева А.Я. – аспирант кафедры фармакологии, e-mail: zveranna@mail.ru

2 группы. Крысам первой группы проводили ложную операцию (два дорсальных разреза, соответствующих проекциям почек). У животных второй группы проводили двухстороннюю адреналэктомию, через неделю после которой их вводили в эксперимент. Хирургические операции проводили под эфирным наркозом. Крысы содержались 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, части животных внутрибрюшинно вводили фуросемид в дозе 20 мг/кг в 12<sup>00</sup> (4,0–4,4 мг), остальным – в 24<sup>00</sup>. Измеряли диурез через 6 и 24 часа после введения препарата. Разница между собранными порциями соответствовала уровню мочеотделения за 18 часов. В собранной моче определяли содержание Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и креатинина, служившего мерой клубочковой фильтрации, а также фуросемида. Электролиты детектировали методом пламенной фотометрии, креатинин – модифицированным методом Поппера, фуросемид – с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В качестве элюентов использовали 80%-й ацетонитрил при градиенте от 0 до 100 % и фосфатный буфер (рН 7). Детектирование проводилось при трех длинах волн – 210, 280 и 320 нм. Для расчетов применялся калибровочный график, который строили, используя стандартный раствор фуросемида в концентрации 1 мг/мл.

Эксперименты проводили при строгом соблюдении 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.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ), и представляли в виде  $M \pm m$ . Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались результаты при  $p < 0,05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены показатели экскреторной функции почек после введения фуросемида ложнооперированным крысам в 12<sup>00</sup> и в 24<sup>00</sup>. Из таблицы видно, что в первые 6 часов независимо от времени введения воздействие препарата на выделение воды и ионов существенно различалось. Так, если диуретический эффект на протяжении суток распределялся более равномерно, составляя за первые 6 часов 40–60 % от суммарного суточного мочеотделения, то вклад первых 6 часов в выделение натрия составил 90–95 % от суточной экскреции этого иона. Как видно из той же таблицы, промежуточное место занимает экскреция калия, которая за первые 6 часов составила 73–85 % от суточного показателя. Интересно, что выделение с мочой креатинина за 6 часов после

Таблица 1

Экскреторная функция почек у крыс после введения фуросемида в разное время суток

Время после введения форусемида	Диурез, мл	Экскреция Na <sup>+</sup> , мкМ	Экскреция K <sup>+</sup> , мкМ	Экскреция креатинина, мкМ	Фуросемид	
					Экскреция, мг	Процент от дозы
Введение в 12 <sup>00</sup>						
Исходный уровень за сутки	3,9 ± 0,34	31 ± 3,0	175 ± 14,1	8,5 ± 0,33	—	—
Через 6 ч	7,1 ± 0,35*	2338 ± 183,8*	854 ± 30,3*	3,7 ± 0,17*	2,18 ± 0,066	54,5
Через 18 ч	<u>10,4 ± 1,95*</u>	191 ± 48,0*	<u>307 ± 31,2*</u>	10,7 ± 0,46*	0,16 ± 0,032	4,0
Через сутки	<u>17,6 ± 2,16*</u>	2576 ± 225,0*	1170 ± 37,6*	14,4 ± 0,42*	2,34 ± 0,084	58,5
Введение в 24 <sup>00</sup>						
Исходный уровень за сутки	3,8 ± 0,43	28 ± 3,4	181 ± 18,7	8,4 ± 0,63	—	—
Через 6 ч	8,1 ± 0,50*	<u>3056 ± 185,1*</u>	<u>1137 ± 64,7*</u>	4,5 ± 0,30*	2,17 ± 0,189	54,3
Через 18 ч	4,7 ± 0,81	186 ± 19,9*	197 ± 14,2	7,8 ± 0,37	0,095 ± 0,005	2,4
Через сутки	12,8 ± 1,03*	<u>3241 ± 184,7*</u>	1335 ± 67,0*	12,3 ± 0,47*	2,27 ± 0,189	56,8

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочками отмечены достоверные изменения по сравнению с исходным уровнем, подчеркнуты достоверные различия между соответствующими показателями после дневного и ночного введения препарата.

введения фуросемида составило около 35 %, а за оставшиеся 18 часов – 65 %, что указывает на определенный вклад повышения скорости клубочковой фильтрации в реализацию диуретического действия фуросемида. Примечательно, что экскреция фуросемида четко коррелировала с экскрецией натрия, составляя 93–95 % от суточного выделения препарата. Это представляется вполне логичным, учитывая, что фуросемид в первую очередь является салуретиком, подавляя активность  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -котранспортера в восходящем отделе петли Генле почечных канальцев [7].

При сравнении эффектов, развившихся после применения фуросемида в ночные и дневные часы, видно, что введение диуретика в 24<sup>00</sup> сопровождалось более значимым воздействием на экскреторную функцию почек крыс в первые 6 часов после инъекции. Особенно это заметно в отношении экскреции электролитов. Так, выделение с мочой ионов натрия через 6 часов после ночного введения фуросемида на 31 % превосходило эффект препарата после его введения в 12<sup>00</sup> ( $p < 0,05$ ), а экскреция калия – на 33 % ( $p < 0,001$ ). В значительно меньшей степени отмеченное различие было характерно для повышения уровня мочеотделения, величина прироста которого после ночного введения на 14 % превосходила показатель, достигнутый после введения в 12<sup>00</sup> (различие недостоверно). Отметим, что зафиксированные изменения происходили на фоне достоверно большего прироста скорости клубочковой фильтрации в первые 6 часов после ночной инъекции фуросемида (на 21,6 %,  $p < 0,05$ ). Важно подчеркнуть, что экскреция фуросемида с мочой в первые часы после его введения, как видно из табл. 1, существенно не изменялась. Последний факт заслуживает особого внимания и может быть объяснен следующим образом. Хорошо известно, что фуросемид, как и большинство других диуретиков, попадает в почечные каналцы главным образом путем секреции в  $\text{S}_2$ -сегменте проксимальных канальцев с помощью системы транспорта органических анионов [7]. По-видимому, этот процесс не подвергается существенным циркадианным колебаниям, что и обуславливает отсутствие каких-либо различий в его экскреции. Так что обнаруженные различия в экскреторной функции, скорее всего, обусловлены суточными флюктуациями канальцевой реабсорбции ионов, процесса, на который воздействует диуретик после попадания в просвет почечных канальцев. Подтверждением этого предположения являются данные последних лет, согласно ко-

торым реабсорбция в канальцах почек подвергается существенным суточным осцилляциям, что обусловлено соответствующими колебаниями экспрессии так называемых часовых генов в клетках канальцев [8–10].

Относительно более поздних изменений экскреторной функции почек отметим, что в течение последующих 18 часов после ночного введения фуросемида диуретическая реакция значительно ослабевала, в результате чего уровень суточного мочеотделения существенно уступил таковому после введения препарата в 12<sup>00</sup>. Эта особенность действия петлевых диуретиков, когда острое ударное воздействие (0–6 часов после введения) сменяется так называемым рикошетом в последующие 6–24 часа, известна в клинике, что несколько ослабляет их эффективность и делает сопоставимыми с тиазидовыми диуретиками [11]. Кроме того, заметим, что зафиксированный более интенсивный рост мочеотделения после дневного введения в последующие 18 часов пришелся на период с 18<sup>00</sup> до 12<sup>00</sup>, т. е. в основном на темное время суток. Что касается экскреции ионов, то прироста, достигнутого в первые 6 часов после ночного введения фуросемида, оказалось достаточно, чтобы обеспечить суточное превосходство в выведении с мочой натрия и калия.

Исходя из результатов, представленных в табл. 1, становится очевидным, что влияние фуросемида на экскреторную функцию почек у крыс более выражено после применения диуретика в ночные часы. Учитывая то, что, в отличие от человека, крысы относятся к животным, ведущим активный ночной образ жизни, можно предположить, что обнаруженные различия обусловлены большей функциональной активностью почек (и в первую очередь процесса канальцевой реабсорбции) у этих грызунов в ночные часы.

Из табл. 2, в которой представлены результаты влияния фуросемида на экскреторную функцию почек у адреналэктомированных крыс, видно, что суточный диурез и экскреция калия у животных с удаленными надпочечниками в исходном периоде были значительно выше, чем у ложнооперированных. Существенно отличалась и реакция адреналэктомированных крыс на введение фуросемида. Из той же таблицы следует, что диуретическое действие фуросемида в условиях адреналэктомии было, если сравнивать с исходными величинами, ослаблено, хотя абсолютные цифры диуреза мало отличались от таковых, полученных у ложнооперированных крыс. Натрийуретическая реак-

Таблица 2

## Экскреторная функция почек у адреналэктомированных крыс после введения фуросемида в разное время суток

Время после введения форусемида	Диурез, мл	Экскреция Na <sup>+</sup> , мкМ	Экскреция K <sup>+</sup> , мкМ	Экскреция креатинина, мкМ	Фуросемид	
					Экскреция, мг	Процент от дозы
Введение в 12 <sup>00</sup>						
Исходный уровень за сутки	9,6 ± 0,95	14 ± 1,1	265 ± 18,8	10,2 ± 2,40	—	—
Через 6 ч	6,6 ± 0,40	1046 ± 129,3*	427 ± 43,8*	2,6 ± 0,25*	1,94 ± 0,130	48,5
Через 18 ч	5,1 ± 1,07	63 ± 14,7*	180 ± 18,9*	6,7 ± 0,72*	0,12 ± 0,030	3,0
Через сутки	11,7 ± 1,23	1106 ± 132,5*	591 ± 48,6*	9,3 ± 0,87	2,06 ± 0,144	51,5
Введение в 24 <sup>00</sup>						
Исходный уровень за сутки	9,6 ± 0,58	17 ± 2,1	256 ± 12,6	10,4 ± 0,38	—	—
Через 6 ч	7,4 ± 0,48	1311 ± 161,5*	484 ± 52,9*	3,2 ± 0,26*	2,20 ± 0,084	55,0
Через 18 ч	5,4 ± 0,59	47 ± 7,3*	188 ± 13,9*	7,2 ± 0,34*	0,16 ± 0,020	3,9
Через сутки	12,8 ± 0,78*	1357 ± 165,8*	671 ± 56,9*	10,3 ± 0,44	2,35 ± 0,082	58,9

ция на введение препарата, хотя и была весьма выраженной, в абсолютных цифрах существенно уступала экскреции натрия, наблюдавшейся у контрольных животных. По-видимому, это обусловлено истощением запасов натрия в организме в результате длительного снижения его реабсорбции вследствие отсутствия гормонов коры надпочечников. Значительно ослабленной оказалась и калийуретическая реакция на введение фуросемида.

Относительно показателей экскреторной функции почек в зависимости от времени введения фуросемида отметим, что столь выраженных различий, как у ложнооперированных крыс, в условиях адреналэктомии зафиксировано не было. Наблюдалось лишь некоторое увеличение диуретического, натрийуретического и калийуретического эффектов после ночного введения препарата в сравнении с дневным – как в ближайшие 6 часов, так и через сутки после инъекции. Впрочем, отмеченное увеличение ни в одном случае не достигло достоверных различий. Так, после введения фуросемида в 24<sup>00</sup> уровень мочеотделения превосходил эффект, полученный от введения в 12<sup>00</sup>, на 6–12 %, натрийурез – на 23–25 %, калийурез – на 13–14 %. На 10–20 % после ночного введения были выше показатели скорости клубочковой фильтрации. Важно отметить, что на 13–14 % больше после ночного введения была и экскреция фуросемида с мочой. Полученные данные указывают на существенную роль надпочечников в обеспечении циркадианных колебаний эффекта диуретика фуросемида в отношении экскреторной функции почек у крыс.

## ВЫВОДЫ

1. У контрольных (ложнооперированных) крыс влияние фуросемида на экскреторную функцию почек наиболее выражено в первые часы после введения в ночной период времени.

2. В условиях адреналэктомии отмеченное различие сохраняется лишь в виде тенденции.

3. Надпочечники вносят определенный вклад в обеспечение суточных колебаний эффекта фуросемида у крыс.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зверев Я.Ф., Брюханов В.М. Влияние циркадных ритмов на выраженность диуретического эффекта фуросемида у крыс // Нефрология. 2006. 10. (2). 77–80.

Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M. The influence of circadian rhythms on the degree of furosemide diuretic effect in rats // Nefrologiya. 2006. 10. (2). 77–80.

2. Брюханов В.М., Зверева А.Я. Роль почки в регуляции суточных ритмов организма // Нефрология. 2010. 14. (3). 17–31.

Bryukhanov V.M., Zvereva A.Ya. The kidney role in regulation of circadian rhythms of the organism // Nefrologiya. 2010. 14. (3). 17–31.

3. Wilkinson C.W. Circadian clocks: showtime for the adrenal cortex // Endocrinology. 2008. 149. (4). 1451–1453.

4. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock // J. Endocrinol. 2009. 200. (1). 3–22.

5. Girotti M., Weinberg M.S., Spencer R.L. Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule //



Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2009. 296. (4). E888–E897.

6. Buijs R.M., Wortel J., Van Heerikhuize J.J. *et al.* Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway // Eur. J. Neurosci. 1999. 11. 1535–1544.

7. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф. Побочные эффекты современных диуретиков. Метаболические и токсико-аллергические аспекты. Новосибирск: ЦЭРИС, 2003. 327 с.

Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F. Side effects of modern diuretics. Metabolic, toxic, and allergic aspects. Novosibirsk: TSERIS, 2003. 327 p.

8. Rohman M.S., Emoto N., Nonaka H. *et al.* Circadian clock genes directly regulate expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE<sub>3</sub> in the kidney // Kidney Int. 2005. 67. 1410–1419.

9. Nishinaga H., Komatsu R., Doi M. *et al.* Circadian expression of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE<sub>3</sub> in the mouse renal medulla // Biomed. Res. 2009. 30. (2). 87–93.

10. Gumz M.L., Stow L.R., Lynch I.J. *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.

11. Reyes A.J., Leary W.P. Clinico-pharmacological reappraisal of the potency of diuretics // Cardio-vasc. Drugs Ther. 1993. 7. (Suppl. 1). 23–28.

## THE ROLE OF ADRENAL GLANDS IN PROVIDING DAILY FLUCTUATIONS OF FUROSEMIDE DIURETIC EFFECT IN RATS

Valery Mikhailovich BRYUKHANOV, Anna Yakovlevna ZVEREVA

Altai state medical university

656038, Barnaul, Lenin's avenue, 40

The aim of this work was to elucidate the role of adrenal glands in providing of previously identified circadian oscillation diuretic activity of furosemide depending on the time of its administration to rats. The effects of furosemide in sham and adrenalectomized animals have been compared. Diuretic was administered intraperitoneally at a dose of 20 mg/kg body weight at 12<sup>00</sup> and 24<sup>00</sup>. Urine output, excretion Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, creatinine and furosemide were measured after 6 and 24 hours. Furosemide administration led to the rapid development of diuretic action that persisted for 24 hours, a significant increase of sodium and potassium excretion, and increase in the daily excretion of creatinine. It was found that the influence of furosemide on the renal excretory function especially in the early hours was more pronounced at night in normal (sham) rats against a comparable diuretic excretion. The registered difference persisted only in the form of trends under conditions of adrenalectomy. It is concluded, that the adrenal glands make the definite contribution to the daily fluctuations of furosemide effect in rats.

**Key words:** furosemide, renal function, daily fluctuations, adrenalectomy.

**Bryukhanov V.M.** – doctor of medical sciences, professor, head of the chair of pharmacology, rector, e-mail: rector@asmu.ru

**Zvereva A.Ya.** – post-graduate student of the chair of pharmacology, e-mail: zveranna@mail.ru