

ФАРМАКОЛОГИЯ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

СХОДСТВО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО И КАЧЕСТВЕННЫЕ РАЗЛИЧИЯ ГИДРУРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 1-ДЕЗАМИНО-АРГИНИН-ВАЗОТОЦИНА И ФУРОСЕМИДА У КРЫС

А. В. Кутина, Ю. В. Наточин¹

Инъекция крысам фуросемида (0,3 мкмоль/100 г массы) или 1-дезамино-аргинин-вазотоцина (1д-АВТ; 0,05 нмоль/100 г массы) вызывает практически равное по величине повышение выделения Na^+ почкой — до 406 ± 20 и 405 ± 23 мкмоль/2 ч соответственно. После инъекции 1д-АВТ повышение экскреции Na^+ почкой сопровождается усилением реабсорбции осмотически свободной воды с $-0,51 \pm 0,05$ до $-2,75 \pm 0,11$ мл/2ч ($p < 0,05$). Инъекция фуросемида, напротив, приводит к значимому снижению реабсорбции осмотически свободной воды до $-0,19 \pm 0,06$ мл/2 ч ($p < 0,05$) и появлению на максимуме диуретической реакции осмотически свободной воды в моче. Эти данные свидетельствуют о том, что фуросемид не только уменьшает реабсорбцию Na^+ , но и блокирует какое-то молекулярное звено действия вазопрессина, связанное с увеличением осмотической проницаемости.

Ключевые слова: фуросемид, 1-дезамино-аргинин-вазотоцин, натрийурез, осмотически свободная вода

ВВЕДЕНИЕ

Уникальные свойства 1-дезамино-аргинин-вазотоцина (1д-АВТ) состоят в том, что он резко усиливает экскрецию натрия почкой и одновременно увеличивает реабсорбцию осмотически свободной воды в ее канальцах [3]. Натрийуретическое действие этого аналога гормона по величине экскретируемой фракции натрия сопоставимо с действием максимальных доз фуросемида, но осуществляется во много меньших дозах. Оба вещества увеличивают диурез, но 1д-АВТ повышает реабсорбцию осмотически свободной воды. Сведений о влиянии фуросемида на канальцевый транспорт осмотически свободной воды не было найдено. Логически из приведенных выше данных, казалось бы, следует, что 1д-АВТ влияет на транспорт натрия и реабсорбцию воды, а фуросемид только угнетает транспорт натрия. Прикладное значение одновременного воздействия на эти процессы очевидно, поскольку единственным способом лечения гипернатриемии является экскреция избытка солей натрия почкой при одновременном увеличении реабсорбции осмотически свободной воды для восстановления осмоосмии. Сопоставление эффекта введения 1д-АВТ и фуросемида на клиренс осмотически свободной воды в почке послужило задачей настоящего исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самках крыс линии Вистар с массой тела 150–220 г. 1д-АВТ вводили внутримышечно на физиологическом растворе в дозе 0,05 нмоль/100 г массы тела, фуросемид инъецировали внутримышечно в дозе 0,3 мкмоль/100 г массы тела. Крыс помещали в клетки-пеналы с проволочным полом и конусовидным сужением, по которому стекала моча. Выделение мочи регистрировали в течение 4 ч. Кровь брали по окончании экспериментов из сонной артерии под эфирным наркозом.

Осмоляльность сыворотки крови и мочи определяли криоскопическим методом на микроосмометре 3300 (“Advanced Instruments, Inc.”, США), концентрацию креатинина — кинетическим методом по реакции Яффе на автоматическом биохимическом анализаторе EOS Bravo W (Италия), концентрацию ионов магния и кальция — в воздушно-ацетиленовом пламени на атомном абсорбционном спектрофотометре Hitachi-508 (Япония). Исследование концентрации ионов натрия и калия проводили на пламенном фотометре Corning-410 (Великобритания) в воздушно-пропановом пламени.

Синтез аналога вазотоцина 1д-АВТ был выполнен ЗАО “Синтез пептидов” [4]. Использован фуросемид (лазикс, “Авентис Фарма”, Индия). Для определения креатинина на автоматическом анализаторе применяли реактивы фирмы “Randox”, при фотометрии и спектрофотометрии — стандарты фирмы “Aldrich Chemical Company Inc.,” США.

¹ Лаборатория физиологии почки и водно-солевого обмена (зав. — акад. РАН Ю. В. Наточин) Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, пр. М. Тореза, 44.

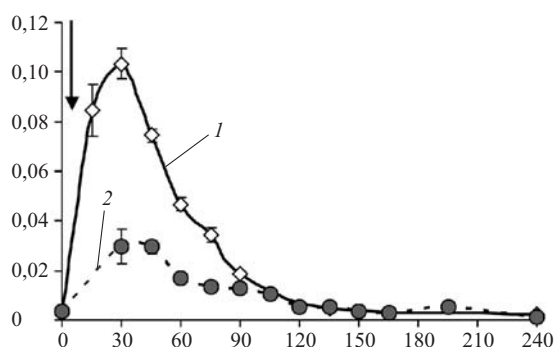


Рис. 1. Динамика диуреза у крыс после инъекции 1д-АВТ и фуросемида: по оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — диурез, мл/мин на 100 г массы тела. Здесь и на рис. 2 и 3 стрелка — внутримышечная инъекция фуросемида 0,3 мкмоль на 100 г массы тела (1) или 1д-АВТ 0,05 нмоль на 100 г массы тела (2).

Статистическую обработку осуществляли с использованием программы Statistica 6, данные представлены в виде $M \pm m$. Различия показателей по отношению к контролю оценивали по тесту ANOVA Крускала-Уоллиса и критерию Данна для множественных сравнений [1]. Различия $p < 0,05$ рассматривали как статистически значимые.

Протокол исследования одобрен этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После инъекции фуросемида в течение первых 30 мин диурез достигает максимальных значений, затем постепенно снижается до исходного уровня (рис. 1). Фуросемид увеличивает экскрецию осмотически активных веществ (рис. 2), в то же время усиливает выделение осмотически свободной воды (рис. 3), что наиболее выражено на максимуме диуретического и салуретического эффекта этого диуретика (рис. 1, 2). Качественно иная картина наблюдается после инъекции 1д-АВТ — растет диурез (рис. 1), повышается экскреция осмотически активных веществ (рис. 2), но резко возрастает реабсорбция осмотически свободной воды на максимуме диуреза и салуреза (рис. 3).

Мочеотделение, вызванное инъекцией фуросемида, по сравнению с контролем за 2 ч опыта растет в 11,5

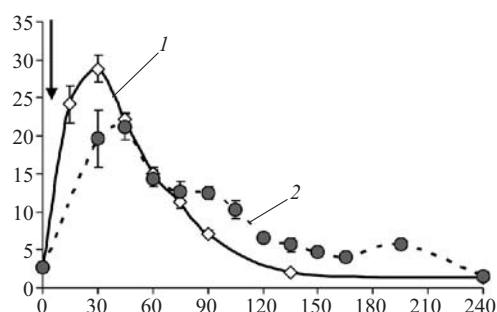


Рис. 2. Выведение осмотически активных веществ после инъекции 1д-АВТ и фуросемида: по оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — экскреция осмотически активных веществ, мкосм/мин на 100 г массы тела; остальные обозначения те же, что на рис. 1.

раза (табл. 1). В основе роста диуреза лежит повышение экскреции ионов натрия, калия, магния и кальция (табл. 1), а в начальном периоде действия фуросемида снижается осмотическая проницаемость стенки канальца и начинается выделение осмотически свободной воды (рис. 3).

Сопоставление данных о действии фуросемида и 1д-АВТ свидетельствует о практически равном увеличении суммарной экскреции осмотически активных веществ и ионов натрия (табл. 1). Экскреция ионов калия выше после инъекции 1д-АВТ, а кальция и магния — после инъекции фуросемида (табл. 1). Реабсорбция осмотически свободной воды после инъекции 1д-АВТ почти в 14,5 раза превышает значение этого показателя в опытах с введением фуросемида. Существенно, что в опытах с фуросемидом реабсорбция осмотически свободной воды становится меньше, чем в контроле (табл. 1).

Полученные результаты выявили новую сторону действия фуросемида на почку, связанную с увеличением экскреции осмотически свободной воды, т.е. с угнетением специфического эффекта аргинин-вазопрессина, направленного на увеличение реабсорбции осмотически свободной воды. Диуретическое действие фуросемида связано не только с угнетением Na^+ , K^+ , 2Cl^- -зависимой реабсорбции ионов в толстом восходящем отделе петли Генле [5], оно могло быть проявлением еще ряда форм его влияния на почку. К ним можно отнести уменьшение почечного сосудистого

Таблица 1. Экскреция воды и ионов почкой крыс после инъекции 1д-АВТ и фуросемида ($n = 20$)

| Суммарная экскреция за 2 ч | Контроль | Фуросемид, 0,3 мкмоль | 1д-АВТ, 0,05 нмоль |
|--------------------------------------|------------------|-----------------------|--------------------|
| Объем мочи, мл | $0,36 \pm 0,04$ | $4,13 \pm 0,17^*$ | $1,54 \pm 0,12^*$ |
| Осмотически активные вещества, мкосм | 262 ± 19 | $1286 \pm 44^*$ | $1277 \pm 63^*$ |
| Натрий, мкмоль | 20 ± 3 | $406 \pm 20^*$ | $405 \pm 23^*$ |
| Калий, мкмоль | 25 ± 2 | $103 \pm 3^*$ | $136 \pm 6^*$ |
| Магний, мкмоль | $1,9 \pm 0,2$ | $9,6 \pm 0,4^*$ | $4,6 \pm 0,4^*$ |
| Кальций, мкмоль | $0,20 \pm 0,06$ | $5,83 \pm 0,84^*$ | $1,83 \pm 0,27^*$ |
| Осмотически свободная вода, мл | $-0,51 \pm 0,05$ | $-0,19 \pm 0,06^*$ | $-2,75 \pm 0,11^*$ |

Примечание. Дозы препаратов и экскреция всех веществ указаны в расчете на 100 г массы тела; * — по отношению к контролю ($p < 0,05$).

сопротивления, вследствие чего происходит увеличение почечного кровотока [7], скорости клубочковой фильтрации, кровотока в мозговом веществе почки [8] и вызванное этим уменьшение осмотического градиента в этой зоне почки. Однако выявленный нами впервые факт снижения реабсорбции осмотически свободной воды и появления ее экскреции явно говорит о воздействии фуросемида на один из этапов внутриклеточных процессов, стимулируемых взаимодействием вазопрессина с V_2 -рецептором. Ранее нами были проведены опыты на модельном объекте — мочевом пузыре лягушки, чтобы выяснить возможное влияние фуросемида на клеточное действие вазопрессина. Было показано, что фуросемид в высоких дозах не только не снижает, но увеличивает, подобно вазопрессину, осмотическую проницаемость стенки мочевого пузыря лягушки, а на клетках этой биологической модели не ингибирует гидроосмотическое действие вазопрессина [6]. Тем самым действие фуросемида на почку отличается от его эффекта на эпителий мочевого пузыря лягушки и находит выражение в изменении реакции клеток собирательных трубок на вазопрессин (рис. 3).

Следовательно, опыты на крысах выявили новую сторону действия фуросемида — в моче появляется осмотически свободная вода, что возможно при торможении встраивания аквапорина 2 в мембрану или ускорении эндоцитоза аквапорина 2 и благодаря этому снижению осмотической проницаемости клеток эпителия собирательных трубок. Эти данные свидетельствуют не только об уникальном эффекте вазотоцина и 1д-АВТ на почку млекопитающих, но и торможении фуросемидом какого-то молекулярного звена в действии вазопрессина, связанного с увеличением осмотической проницаемости.

Положительный баланс натрия в организме клинически может проявляться либо в виде отеков, либо гипернатриемии. В первом случае накопление натрия сопровождается повышением осмоляльности крови, последующей адекватной реакцией системы осморегуляции, стимуляцией секреции вазопрессина, увеличением реабсорбции воды в собирательных трубках почки, в конечном счете, нормализацией осмоляльности крови параллельно с увеличением объема внеклеточной жидкости. Иначе говоря, появляются отеки в условиях изоосмии. Другой вариант развития событий наблюдается при гипернатриемии. В этом случае задержка солей натрия в организме, независимо от вызвавшей ее причины, находит выражение в гипернатриемии, гиперосмии. Симптоматическая терапия должна быть разной в упомянутых выше случаях: удаление солей натрия и воды при отеках и усиленная экскреция солей натрия в сочетании с реабсорбцией осмотически свободной воды при гипернатриемии.

В арсенале современной фармакологии есть ряд высоко эффективных средств для нормализации водно-солевого баланса при первом варианте развития

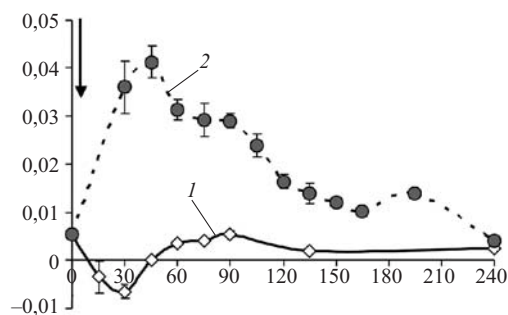


Рис. 3. Реабсорбция осмотически свободной воды после введения 1д-АВТ и фуросемида: по оси абсцисс — время опыта, мин; по оси ординат — реабсорбция осмотически свободной воды, мл/мин на 100 г массы тела; остальные обозначения те же, что на рис. 1.

патологии. К их числу относятся мочегонные препараты, уменьшающие реабсорбцию натрия, например, петлевые диуретики, действующие в толстом восходящем отделе петли Генле, прежде всего, фуросемид. На максимуме диуреза, вызванного этим салуретиком, усиление мочеотделения обусловлено снижением реабсорбции натрия и осмотически связанной с ним воды, растет натрийурез, увеличивается объем выделяющейся мочи. Следует обратить внимание на важный факт: осмоляльность мочи при этом типе диуреза приближается к осмоляльности плазмы крови, а концентрация ионов натрия в моче остается ниже его концентрации в плазме крови. Следовательно, общее количество натрия в организме уменьшается, а его концентрация в плазме крови, внеклеточной жидкости должна повышаться! Это происходит потому, что концентрация натрия в моче ниже, чем в сыворотке крови (табл. 2). Отсюда следует, что фуросемид показан при отеках, особенно в условиях изонатриемии, но необходимы иные подходы для устранения тех форм патологии, которые сопровождаются гипернатриемией.

В последнем случае единственным патогенетически возможным в настоящее время вариантом могло быть применение 1д-АВТ и ряда иных аналогов аргинин-вазотоцина [2], если бы они существовали в виде лекарственной формы. Они обладают уникальным свойством, строго специфично направленным на лечение состояний, сопровождающихся гипернатриемией. Вазотоцин и его аналоги угнетают реабсорбцию солей

Таблица 2. Концентрация натрия в моче после инъекции фуросемида и 1д-АВТ

| Показатель | Фуросемид, 0,3 мкмоль | 1д-АВТ, 0,05 нмоль |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| U_{Na} , ммоль/л | 103 ± 12 (n = 20) | 265 ± 38 (n = 20) |
| P_{Na} , ммоль/л | | 141 ± 1 (n = 10) |

Примечание. U_{Na} — концентрация натрия в моче на максимуме диуреза, P_{Na} — концентрация натрия в сыворотке крови у контрольных крыс. Дозы препаратов указаны на 100 г массы тела.

натрия и одновременно усиливают реабсорбцию осмотически свободной воды. Другой вариант лечения этих состояний должен включать усиление экскреции натрия благодаря применению диуретиков в сочетании с одновременным увеличением потребления воды для снижения осмоляльности крови.

ВЫВОДЫ

1. Инъекция крысе фуросемида (0,3 мкмоль/100 г массы тела) или 1-деамино-аргинин-вазотоцина (0,05 нмоль/100 г массы тела) вызывает практически равное увеличение экскреции Na^+ почкой.

2. Натрийурез при действии 1-деамино-аргинин-вазотоцина сопровождается усилением, а при инъекции фуросемида значимым снижением реабсорбции осмотически свободной воды.

3. Впервые установлена способность фуросемида снижать осмотическую проницаемость стенки почечного канальца и увеличивать клиренс осмотически свободной воды.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 08-04-00610), программы “Ведущие

научные школы” (проект НШ-4414.2008.4.) и программы ОБН РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999).
2. А. В. Кутина, И. И. Елисеев, М. И. Титов, Ю. В. Наточин, *Докл. АН*, **422**(4), 564 – 567 (2008).
3. Ю. В. Наточин, Т. А. Канашкина, Д. Ю. Мордвинцев, Е. И. Шахматова, *Рос. физиол. ж.*, **93**(6), 625 – 634 (2007).
4. Ю. В. Наточин, Т. А. Канашкина, Е. И. Шахматова и др., *Экспер. клин. фармакол.*, **71**(2), 32 – 35 (2008).
5. D. H. Ellison and C. S. Wilcox, *Brenner and Rector's The Kidney*, 8th ed., Saunders, Elsevier, Philadelphia, 2, 1646 – 1678, (2008).
6. Y. Natochin and E. Shakhmatova, *Physiol. Bohemoslov.*, **25**(6), 529 – 534 (1976).
7. M. D. Okusa and D. H. Ellison, *Seldin and Giebisch's The Kidney. Physiology and Pathophysiology*, Elsevier, Amsterdam, 1, 1051 – 1094 (2008).
8. L. L. Woods, D. R. DeYoung, and B. E. Smith, *Am. J. Physiol.*, **261**(5), F815 – F823 (1991).

Поступила 09.06.09

SIMILARITY OF NATRIURETIC ACTION AND QUALITATIVE DIFFERENCES OF HYDROURETIC ACTION OF 1-DEAMINO-ARGININE-VASOTOCIN AND FUROSEMIDE IN RATS

A. V. Kutina and Yu. V. Natochin

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, M. Thorez prosp. 44, St. Petersburg, 194223, Russia

Injections of furosemide at a dose of 0.3 μmol per 100 g body weight or 1-deamino-arginine-vasotocin (1dAVT) at a dose of 0.05 nmol per 100 g body weight induced nearly equal increase in urinary sodium excretion: up to 406 ± 20 and 405 ± 23 $\mu\text{mol}/2$ h, respectively. Increase in urinary sodium excretion after injection of 1d-AVT was followed by enhancement of solute free water reabsorption from -0.51 ± 0.05 to -2.75 ± 0.11 ml/2 h ($p < 0.05$). On the contrary, furosemide injection induced a significant decrease in solute free water reabsorption to -0.19 ± 0.06 ml/2 h ($p < 0.05$) and led to the appearance of solute free water in urine during peak of diuretic reaction. These data for the first time show that furosemide not only decreases sodium reabsorption, but also blocks some component in molecular mechanism of vasopressin-dependent increase of the osmotic permeability of water.

Key words: Furosemide, 1-deamino-arginine-vasotocin, natriuresis, solute free water