

ФАРМАКОЛОГИЯ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ЛЕЧЕБНОЕ ДЕЙСТВИЕ АЦЕТИЛЦИСТЕИНА ПРИ ГЕНТАМИЦИНОВОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС¹

О. А. Борисёнок, М. И. Бушма, О. В. Барабан, С. М. Зиматкин²

Гентамицин (60 мг/кг, внутривнутрино, 1 раз в день, 10 дней) оказывает нефротоксическое действие у крыс, проявляющееся некрозом эпителия проксимальных извитых канальцев, особенно корковых нефронов, снижением клиренса креатинина и повышением содержания белка в моче. Ацетилцистеин (40 мг/кг, внутривнутрино, 1 раз в день, 10 дней) в значительной степени ослабляет проявления гентамициновой нефропатии. Под его влиянием появляются нормальные канальцы, отсутствующие у крыс, получавших гентамицин; снижается количество некротизированных проксимальных извитых канальцев корковых нефронов, уменьшается их внутренний диаметр, увеличивается высота выстилающих эпителиоцитов. Содержание детрита в канальцах юкстамедуллярных нефронов снижается. Увеличивается активность щелочной фосфатазы в проксимальных извитых канальцах корковых нефронов и юкстамедуллярных нефронов, лактатдегидрогеназы в корковых нефронах.

Ключевые слова: крысы, гентамициновая нефропатия, ацетилцистеин

ВВЕДЕНИЕ

Аминогликозидные антибиотики (гентамицин и др.) — эффективные лекарственные средства при инфекционных заболеваниях (сепсис и др.), вызываемых грамотрицательными микроорганизмами [5]. Однако их широкое применение в значительной степени ограничивается развитием нефро- и ототоксичности. До 25 % случаев применения аминогликозидов осложняются развитием нефропатий различной степени выраженности [3].

Ранее нами показано, что кролики с генетически сниженным уровнем восстановленного глутатиона (GSH) в почках предрасположены к развитию гентамициновой нефропатии [1]. Это послужило основанием для испытаний ацетилцистеина (АЦЦ), являющегося предшественником внутриклеточного антиоксиданта — GSH, в качестве потенциального нефрозащитного средства у крыс с гентамициновой нефропатией [8, 14].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 24 беспородных крысах-самках массой 250 – 300 г. Гентамицин (60 мг/кг; РУП “Борисовский завод медицинских препаратов”, Беларусь) и АЦЦ (40 мг/кг; РУП “Белмедпрепараты”, Бела-

рус) в виде раствора в ампулах, а также H₂O инъецировали внутривнутрино 1 раз в день, 10 дней [6, 9, 10]. Через 2 ч после последнего введения веществ крыс помещали в обменные клетки и собирали мочу в течение 24 ч. Затем животных выводили из опыта. О характере и степени развития аминогликозидной нефропатии судили по данным морфологических, морфометрических и гистохимических исследований почек, а также клинико-биохимических исследований плазмы и мочи.

Кусочки почек фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Определяли степень поражения нефронов. Содержание рибонуклеопротеинов и фукомицинов (нейтральные глюкозаминогликаны, выявляемые ШИК-реакцией), активность щелочной и кислой фосфатаз, лактатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы определяли гистохимически [2].

О функциональном состоянии почек судили на основании результатов исследований плазмы и мочи с использованием применяемых в клинической практике методов исследований. Определяли клиренс креатинина и содержание белка в моче.

Количественную оценку полученных результатов проводили с использованием непараметрической статистики Манна-Уитни [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Введение крысам гентамицина сопровождается выраженным нарушением структуры почек. Под его влиянием повреждается или некротизируется эпителий проксимальных извитых канальцев (ПИК) корковых и в меньшей степени юкстамедуллярных нефро-

¹ Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований при СМ РБ (грант Б09 – 011).

² Кафедра фармакологии (зав. — М. И. Бушма) Учреждение образования “Гродненский государственный медицинский университет”, Республика Беларусь, 230009, Гродно, ул. Горького, 80.

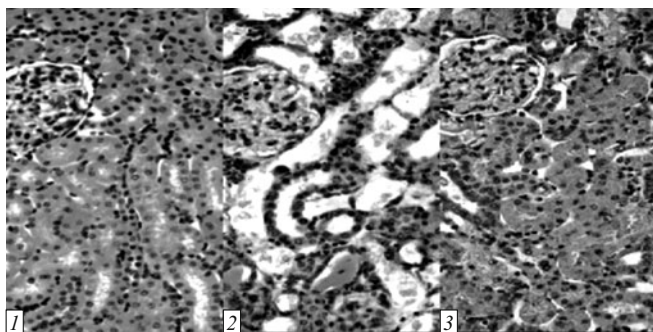


Рис. 1. Подкапсулярная область коркового вещества почки крысы: почечные тельца и проксимальные извитые канальцы.

1 — контроль, нормальное строение проксимальных извитых канальцев корковых нефронов; 2 — гентамицин, преобладают резко расширенные канальцы с сильными повреждениями или погибшие; 3 — гентамицин + ацетилцистеин; частичная нормализация строения проксимальных извитых канальцев. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

нов (КН, ЮН). Процент некротизированных, сильно и умеренно поврежденных ПИК КН составляет соответственно 40, 41 и 16 %. Нормальные канальцы отсутствуют. Увеличиваются наружный и внутренний диаметры ПИК КН, снижается высота выстилающих канальцы эпителиоцитов (соответственно на 7 %, в 6,3 и 2,6 раза) (таблица, рис. 1).

ПИК и дистальные извитые канальцы (ДИК) расширены и переполнены клеточным детритом (32 % — в ПИК ЮН, 36 % — в ДИК ЮН). Их содержимое представлено большим количеством гликопротеинов гликокаликса щеточной каемки. В КН и ЮН уменьшается активность щелочной фосфатазы (соответственно в 3 и 1,8 раза). В эпителиоцитах, выстилающих ПИК КН, снижена активность лактатдегидрогеназы на 35 % и кислой фосфатазы на 65 % (таблица, рис. 1, 2).

Нарушение гентамицином структуры почек сопровождается нарушением их функции. Это подтверждается снижением клиренса креатинина в 5 раз, а также повышением содержания белка в моче в 7 раз (таблица).

Таким образом, результаты морфо-гистохимических исследований почек и биохимических исследований плазмы и мочи крыс свидетельствуют о выраженном нарушении гентамицином структуры эпителиоцитов (преимущественно ПИК КН) и функции почек.

АЦЦ (внутрибрюшинно, 40 мг/кг, 1 раз в день, 10 дней) оказывает нефрозащитное действие у крыс с гентамициновой нефропатией. Об этом свидетельствует снижение количества некротизированных ПИК КН (на 65 %), а также повышение числа умеренно поврежденных (в 2,8 раза) и появление нормальных ПИК КН, отсутствующих у крыс, получавших гентамицин. Уменьшается внутренний диаметр ПИК КН, а также увеличивается высота выстилающих их эпителиоцитов, соответственно на 53 и 87 %. Количество ПИК и ДИК ЮН, заполненных детритом, уменьшается (\approx в 3 раза). Активность щелочной фосфатазы в ПИК КН, ЮН и лактатдегидрогеназы в ПИК КН увеличивается на 28, 61 и 29 % (таблица, рис. 1, 2).

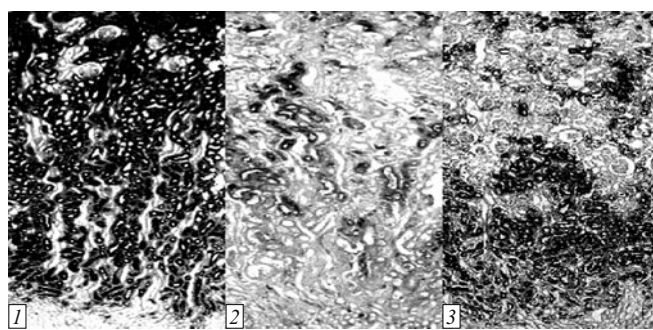


Рис. 2. Активность щелочной фосфатазы в корковом веществе почек крысы.

1 — контроль, высокая активность фермента в щеточной каёмке проксимальных извитых канальцев; 2 — гентамицин, резкое снижение активности фермента, особенно в корковых нефронах; 3 — гентамицин + ацетилцистеин; частичная нормализация активности фермента в корковых и юкстамедуллярных нефронах. Окраска по Гомори. $\times 25$.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о нефротоксическом действии гентамицина у крыс. Основной мишенью являются проксимальные извитые канальцы. В механизме такого действия антибиотика, по-видимому, важную роль играет его накопление в ПИК КН с последующим образованием цитотоксических свободнорадикальных соединений [12].

АЦЦ оказывает выраженное нефрозащитное действие. Под его влиянием улучшается структура почек. Предполагается, что основная роль в этом принадлежит его антиоксидантным свойствам. Известно, что АЦЦ способен нейтрализовать свободные радикалы за счет наличия SH-группы [7]. Кроме того, он является донатором цистеина для синтеза восстановленного глутатиона. Последний является сильнодействующим внутриклеточным антиоксидантом [15]. Нефрозащитное действие АЦЦ установлено также при экспериментальных нефропатиях, вызванных накоплением в почках цитотоксических свободнорадикальных соединений (рентгеноконтрастные лекарственные средства, цисплатин, циклоспорин, кадмий) [8, 11, 13, 14]. Отсутствие нормализующего действия АЦЦ на клиренс креатинина и содержание белка в моче (показатели, характеризующие клубочковую фильтрацию) можно объяснить, исходя из того обстоятельства, что основной мишенью его нефрозащитного действия являются ПИК КН, а не клубочки.

ВЫВОДЫ

1. Гентамицин оказывает нефротоксическое действие у крыс, проявляющееся преимущественно гибелью эпителия проксимальных извитых канальцев корковых нефронов (ПИК КН), снижением клиренса креатинина, а также другими нарушениями структуры и функции почек.

2. Ацетилцистеин в значительной степени ослабляет проявления гентамициновой нефропатии. При его назначении снижается степень структурных и гистохимических нарушений в ПИК КН и ЮН.

Влияние гентамицина (внутрибрюшинно, 60 мг/кг, 1 раз в день, 10 дней), отдельно, и в комбинации с ацетилцистеином (внутрибрюшинно, 40 мг/кг, 1 раз в день, 10 дней) на структуру и функцию почек крыс

Показатели	Группы животных		
	H ₂ O (интактные)	Гентамицин (контроль)	Гентамицин + ацетилцистеин (опыт)
1	2	3	4
Степень поражения ПИК КН (%):			
погибшие	0,0 (0,0; 0,0)	40,0 (20,5; 56,5) 0,00 (0,001)	14,0 (7,0; 21,0) 0,00 <u>0,00(0,001)</u> 7,00(0,015)
сильно повреждённые	0,0 (0,0; 0,0)	40,5 (34,5; 48,0) 0,00 (0,001)	35,0 (21,0; 36,0) <u>0,00(0,001)</u> 12,00(0,064)
умеренно повреждённые	4,5 (4,0; 7,5)	16,0 (6,5; 39,0) 9,00 (0,016)	45,0 (40,0; 52,0) <u>0,00(0,001)</u> 8,00(0,021)
нормальные	95,5 (92,5; 96,0)	0,0 (0,0; 0,0) 0,00 (0,001)	3,0 (2,0; 15,0) <u>0,00(0,001)</u> 0,00(0,001)
Размеры ПИК КН (мкм):			
наружный диаметр	29,53 (28,67; 30,64)	31,72 (30,96; 33,22) 8,00 (0,012)	30,26 (30,20; 32,35) <u>15,00(0,132)</u> 19,00(0,298)
внутренний диаметр	3,38 (2,75; 4,38)	21,20 (19,30; 23,77) 0,00 (0,001)	9,89 (4,04; 12,07) <u>4,00(0,005)</u> 7,00(0,015)
высота эпителиоцитов	12,81 (12,53; 13,41)	4,93 (4,34; 5,79) 0,00 (0,001)	9,23 (8,83; 12,27) <u>4,00(0,005)</u> 8,00(0,021)
Канальцы, заполненные детритом (%):			
ПИК ЮН	0,0 (0,0; 0,0)	32,00 (20,50; 35,50) 0,00 (0,001)	11,00 (7,50; 13,50) <u>0,00(0,001)</u> 2,50(0,002)
ДИК ЮН	0,0 (0,0; 0,0)	35,50 (32,00; 42,50) 0,00 (0,001)	12,50 (8,50; 17,50) <u>0,00(0,001)</u> 0,00(0,001)
Щелочная фосфатаза (ЕД ОП) в ПИК:			
КН	0,54 (0,50; 0,56)	0,18 (0,15; 0,21) 0,00 (0,001)	0,23 (0,20; 0,30) <u>0,00(0,001)</u> 13,00(0,046)
ЮН	0,50 (0,35; 0,52)	0,28 (0,21; 0,34) 4,00 (0,005)	0,45 (0,40; 0,51) <u>22,00(0,487)</u> 7,00(0,009)
Лактатдегидрогеназа (ЕД ОП) в ПИК КН			
	0,26 (0,18; 0,27)	0,17 (0,12; 0,19) 7,00 (0,025)	0,22 (0,21; 0,27) <u>28,00(1,00)</u> 2,00(0,003)
Кислая фосфатаза (ЕД ОП) в ПИК КН			
	0,62 (0,58; 0,74)	0,22 (0,13; 0,45) 0,00 (0,001)	0,28 (0,25; 0,43) <u>0,00(0,001)</u> 23,00(0,345)
Клиренс креатинина (мл/мин)			
	0,84 (0,31; 1,08)	0,17 (0,09; 0,48) 13,00 (0,03)	0,38 (0,22; 0,53) <u>20,00(0,57)</u> 20,00(0,14)
Белок в моче (г/л)			
	0,11 (0,05; 0,15)	0,78 (0,58; 1,61) 1,50 (0,001)	0,99 (0,62; 1,25) <u>0,00(0,001)</u> 40,00(0,68)

Примечание. Первые цифры таблицы — значения медиан с нижними и верхними квартилями (в скобках). Вторые: в числителе — значения критерия U Манна — Уитни и уровня значимости p (в скобках) в сравнении с крысами, получавшими H₂O (интактные); в знаменателе — соответственно в сравнении с нелечеными животными, получавшими гентамицин (контроль). Полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия показателей ($p < 0,05$). ПИК — проксимальные извитые канальцы, КН — корковые нефроны, ЮН — юкстамедуллярные нефроны, ДИК — дистальные извитые канальцы, ЕД ОП — единицы оптической плотности, ед — единицы условные.

ЛИТЕРАТУРА

1. К. М. Бушма, М. И. Бушма. *Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі, серыя медыцынскіх навук*, № 1, 47 – 50 (2010).
2. А. И. Кононский, *Гистохимия*, Вища школа, Киев (1976).
3. П. Марино, *Интенсивная терапия*, пер. с английского, доп. ГЭОТАР “Медицина”, Москва (1999).
4. О. Е. Реброва, *Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Медиа Сфера*, Москва (2002).
5. Л. С. Страчунский, С. Н. Козлов, *Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей*, Боргес, Москва (2002).
6. К. А. Abu-Stephan, А. А. Abdel-Gayoum, *Arch. Toxicol.*, **75**(5), 284 – 290 (2001).
7. О. I. Aruoma, J. Bucler, B. Halliwell, B. M. Hoesy, *Free Radic. Biol. Med.*, **6**(6), 593 – 597 (1989).
8. D. T. Dickey, N. D. Doolittle, L. L. Muldoon, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **62**(2), 235 – 241 (2008).
9. S. Efrati, S. Berman, Y. Siman-Tov, et al., *Neph. Dial. Transpl.*, **24**(12), 1023 – 1030 (2007).
10. J. I. Enziguez, M. Schydlower, K. C. O’Hair, et al., *Vet. Hum. Toxicol.*, **34**(1), 32 – 35 (1992).
11. G. Marenzi, E. Assanelli, I. Marana, et al., *N. Engl. J. Med.*, **354**, 2773 – 2782 (2006).
12. C. F. Simmons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**(3), 709 – 715 (1980).
13. M. Tariq, C. Morais, S. Sobki, et al., *Neph. Dialysis Transpl.*, **14**, 4923 – 4929 (1999).
14. B. Wispriyono, H. Igisu, K. Matsuno, M. Matsuoka, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**(1), 344 – 351 (1998).
15. I. Ziment, *Biomed. Pharmacother.*, **42**(8), 513 – 520 (1988).

Поступила 09.06.11

THERAPEUTIC EFFECT OF ACETYLCYSTEINE ON RATS WITH GENTAMICIN-INDUCED NEPHROPATHY

O. A. Borisenok, M. I. Bushma, O. V. Baraban, and S. M. Zimatkin

Grodno State Medical University, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230009 Belarus Republic

Gentamicin (60 mg/kg, i.p., once per day for 10 days) produces a nephrotoxic effect in rats, which is manifesting by the epithelium necrosis of proximal convoluted tubules (especially of cortical nephrons), decreasing creatinine clearance, and increasing protein in the urine. Acetylcysteine (40 mg/kg, i.p., once per day for 10 days) significantly decreases manifestations of the gentamicin nephrotoxicity. Acetylcysteine administration leads to the appearance of normal tubules (absent in rats treated by gentamicin), decreases the number of necrotized proximal convoluted tubules of cortical nephrons and reduces their internal diameter, and increases the height of paving epitheliocytes. The content of detrite in tubules of juxtamedullar nephrons decreases, while the activity of alkaline phosphatase in proximal convoluted tubules of cortical and juxtamedullar nephrons and the activity of lactatedehydrogenase in cortical nephrons increases.

Key words: Gentamicin nephropathy, acetylcysteine