

А.І. Гоженко, М.П. Владимирова, О.А. Топор

Вплив бурштинової кислоти на функцію нирок білих щурів при гентаміциновій нефропатії

В опытах на нелинейных белых крысах самцах-массой 100–120 г, которым в условиях индуцированного водного диуреза подкожно вводили янтарную кислоту, нейтрализованную 10%-м раствором NaOH, в концентрации 0,14 ммоль/л одновременно с внутривнутрибрюшинным введением гентамицина в дозе 10 мг/кг массы тела 1 раз в день в течение 7 сут, показано положительное действие янтарной кислоты как энергетического субстрата на ряд показателей функционального состояния почек. Так, наблюдалось улучшение реабсорбции в проксимальных канальцах почек, что проявилось в снижении протеинурии, вторичной нормализации клубочковой фильтрации, что приводило к уменьшению азотемии и других проявлений острой почечной недостаточности.

ВСТУП

Відомо, що антибіотики, зокрема гентаміцин, викликають розвиток медикаментозних нефропатій [1, 11], що зумовлено як їх токсичністю, так і переважним виведенням із організму нирками [13, 18]. Нами показано, що гентаміцин після внутрішньоочеревинного однократного введення у терапевтичній дозі викликає значну протеїнурію, що свідчить про ураження переважно проксимальних канальців нирок, та одночасно суттєво знижує клубочкову фільтрацію [3]. До цього часу не повністю вивчені провідні механізми токсичної дії гентаміцину на нирки. Встановлено, що він призводить до прогресування канальцевих дисфункцій, яке пов'язане з накопиченням великої кількості препарату у цьому відділі нефрону після клубочкової фільтрації та секреції гентаміцину клітинами епітелію канальців [2, 12–14, 16]. Дані літератури свідчать про те, що при гентаміциновій нефропатії найбільш суттєві морфологічні порушення відбуваються у клітинах проксимальних канальців нефрону [11, 17]. Наслідками при цьому повинні бути порушення функції прокси-

мального відділу нефрону, серед яких найбільш небезпечним є протеїнурія. За даними наших досліджень, у клініці домінують наслідки зменшення клубочкової фільтрації (КФ), проявом чого є ретенційна азотемія аж до розвитку гострої ниркової недостатності [3]. Раніше нами було показано, що зменшення КФ відбувається за механізмом клубочково-канальцевого балансу [5, 6]. Тобто при гентаміциновій нефропатії первинним є пошкодження клітин ниркових канальців. Відомо, що антибіотики викликають пошкодження мітохондрій, яке згідно з генетичною класифікацією мітохондріальних хвороб D. De Vivo (1993), відноситься до набутого (вторинного). Ушкодження структури мітохондрій і пов'язані з цим функціональні зміни органел призводять до енергетичної недостатності клітини та порушення трансепітеліального транспорту іонів та органічних речовин у нирках [6, 7]. Існує теорія виникнення мітохондрій, відповідно до якої у процесі філогенезу органела як бактерія-сімбіонт вросла у клітину. Тому антибіотики, діючи на мікробну клітину, призводить до пошкодження мітохондрій. Зокрема, гентаміцин

© А.І. Гоженко, М.П. Владимирова, О.А. Топор

викликає нефротоксичну дію на мітохондрії кіркової речовини нирок за допомогою активації перекисного окиснення ліпідів і продукції значної кількості вільних радикалів [19]. Раніше отримані нами дані підтверджують наявність ниркових порушень, які відповідають вищенаведеним. Уже через 2 год після одноразового введення гентаміцину спостерігається збільшення осмоляльності сечі, зменшення реабсорбції осмотично активних речовин (ОАР) і зниження КФ [3]. Виявлені порушення підсилюються при курсовому введенні гентаміцину впродовж 7 діб. Ці дані дозволили нам припустити, що використання метаболітів циклу Кребса, здатних позитивно впливати на енергообмін у нирках [8, 9], може зменшити ступінь ниркових порушень. Раніше для цього ми успішно використовували бурштинову кислоту (БК) при сулемовій нефропатії [4], що дало нам змогу припустити можливу ефективність її використання для метаболічної корекції енергетичного обміну та функцій нирок при гентаміциновій нефропатії.

Метою нашого дослідження було вивчення діурезу, вмісту та екскреції білка з сечею, вмісту креатиніну у плазмі крові та сечі, екскреції креатиніну з сечею, кліренсу креатиніну, осмоляльності плазми крові та сечі, екскреції, реабсорбції та кліренсу ОАР, показників реабсорбції води та процесів КФ і реабсорбції ОАР після курсового введення гентаміцину та ефективність використання БК для корекції токсичної нефропатії.

МЕТОДИКА

Експеримент проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 100–120 г за умов індукованого водного діурезу. Тваринам 1-ї групи (n=10) гентаміцин вводили внутрішньоочередовинно один раз на добу у дозі 10 мг/кг, що відповідає терапевтичній дозі препарату [13, 17], впродовж 7 діб. Щурам 2-ї групи (n=10) протягом цього ж терміну

одночасно вводили БК, нейтралізовану 10%-м розчином NaOH, із розрахунку 0,14 ммоль/л [4, 6] підшкірно один раз на добу та гентаміцин у дозі 10 мг/100 г внутрішньоочередовинно однократно. Контрольній групі щурів (n=10) внутрішньоочередовинно вводили воду для ін'єкцій. Сечовидільну й екскреторну функції нирок вивчали на 7-му добу після введення тваринам у шлунок дистильованої води у кількості 5 % від маси тіла за допомогою металевого зонда з подальшим збиранням сечі у метаболічних клітках протягом 2 год, після чого проводили декапітацію тварин під ефірним наркозом і забір крові. Визначали вміст отриманої сечі та концентрацію загального білка у сечі сульфасаліциловим методом на спектрофотометрі СФ–46 при довжині хвилі 290 нм. Концентрацію креатиніну у сечі та плазмі крові визначали за реакцією з пікриновою кислотою на спектрофотометрі СФ–46 при довжині хвилі 520 нм, осмоляльність сечі та плазми – на осмометрі ЗДЗ (США). КФ розраховували за кліренсом ендogenous креатиніну [10]; також визначали екскрецію білка та осмотично активних речовин (натрій, калій, хлор, сечовина тощо) за годину відносно екскреції креатиніну і при розрахунку на 1 мл КФ. Поряд з цим визначали інтенсивність реабсорбції та екскрецію ОАР, кліренс і фракцію осмотично вільної води [10]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel 7.0. У таблицях ступінь достовірності вказана лише для статистично вагомої різниці отриманих показників ($P \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень свідчать, що введення гентаміцину впродовж 7 діб, призводить до значної зміни деяких показників функціональної діяльності нирок (діурезу, концентрації та екскреції білка з сечею, концентрації креатиніну у плазмі

крові та сечі, екскреції креатиніну та ОАР). Так, згідно з результатами, наведеними у табл. 1, суттєво зменшується діурез (у 2 рази). У щурів 2-ї групи дослідів, яким вводили гентаміцин одночасно з БК упродовж 7 діб спостерігалось істотне збільшення абсолютного та відносного діурезу порівняно з тваринами 1-ї групи та незначне

зменшення значень цих показників порівняно з контролем, що свідчить про позитивний вплив БК на діурез до майже повного його відновлення.

Чітко реєстрували різке збільшення екскреції білка у щурів обох груп, але слід відмітити, що у щурів 2-ї групи виділення білка з сечею вдвічі менше порівняно з

Таблиця 1. Вплив гентаміцину та бурштинової кислоти на функцію нирок та деякі показники плазми крові у білих щурів за умов індукованого водного діурезу (M±m; n=10)

Показник	Контроль	Введення гентаміцину (1-ша група)	Введення гентаміцину і бурштинової кислоти (2-га група)
Діурез, мл/2год	1,65±0,18	0,89±0,04 P<0,001	1,49±0,18 P ₂ <0,02
Діурез, мл · год ⁻¹ · 100 г ⁻¹	1,79±0,08	0,54±0,03 P<0,001	0,99±0,11 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Діурез, %	64,51±7,10	21,64±1,21 P<0,001	36,23±4,25 P ₁ <0,01 P ₂ <0,02
Концентрація білка у сечі, г/л	0,082±0,007	0,52±0,007 P<0,001	0,26±0,03 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Екскреція білка, г/год	0,014±0,001	0,28±0,02 P<0,001	0,25±0,03 P ₁ <0,001
Креатинін сечі, мкмоль/л	1686,0±140,0	934,25±19,46 P<0,001	1919,38±81,33 P ₁ <0,02 P ₂ <0,001
Креатинін плазми крові, мкмоль/л	57,28±3,22	185,10±1,13 P<0,001	178,7±7,26 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Екскреція креатиніну, мкмоль/год	2,68±0,24	0,50±0,03 P<0,001	1,90±0,11 P ₁ <0,01 P ₂ <0,001
Осмоляльність сечі, мосмоль/л	157,10±11,52	183,38±3,46 P<0,01	152,5±23,16 P ₁ <0,01
Осмоляльність плазми крові, мосмоль/л	294,00±4,00	295,10±6,52	293,7±9,27
Креатинін сечі/креатинін плазми крові	8,39±0,19	5,03±0,11 P<0,001	10,74±0,16 P ₁ <0,001
Осмоляльність сечі/осмоляльність плазми	0,92±0,04	0,64±0,01 P<0,001	0,52±0,07 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
(Креатинін сечі/креатинін плазми крові)/(осмоляльність сечі/осмоляльність плазми)	9,12±0,33	7,86±0,22 P<0,05	20,65±0,24 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001

Примітка. P – достовірність між контрольною групою тварин та щурами 1-ї групи, P₁ – між контрольною групою тварин та щурами 2-ї групи, P₂ – між тваринами 1-ї та 2-ї груп.

тваринами 1-ї групи, що, можливо, свідчить про менш виражене пошкодження проксимальних канальців, імовірно, внаслідок відновлення енергетичного балансу в їх клітинах.

Нами також виявлено підвищення вмісту креатиніну в плазмі крові майже втричі у щурів 1-ї та 2-ї груп порівняно з контролем. При цьому спостерігалася тенденція до зменшення значення цього показника у тварин 2-ї групи на відміну від тварин, яким не вводили БК. Вміст креатиніну в сечі у щурів 2-ї групи підвищувався незначно, а у щурів 1-ї групи навіть дещо знижувався. Також спостерігалася значне п'ятиразове зменшення екскреції креатиніну у тварин 1-ї групи і менш суттєве (у 1,5 рази) – у тварин 2-ї групи, що свідчить про позитивний вплив БК як на функцію проксимальних канальців, так і на стан процесу КФ. Підтвердженням останнього, по-перше, є результати, наведені у табл. 2, які вказують на зменшення (у 3 рази) показників КФ за кліренсом ендogenous креатиніну у щурів 2-ї групи порівняно з контролем, ніж у тварин 1-ї групи (у 12 разів). Кліренс креатиніну у щурів 2-ї групи був істотно вищим (у 4 рази) порівняно з показниками у щурів, яким не вводили БК. По-друге, при розрахунку протеїнурії на одиницю екскреції креатиніну та 1 мл КФ встановлено значне збільшення показників відносної протеїнурії у щурів 1-ї групи, ніж у щурів 2-ї групи, що вказує на значну втрату білка кожним діючим нефроном у щурів зі змодельованою гентаміциновою нефропатією і на суттєве порушення функції проксимальних канальців, в яких відбувається реабсорбція білка під дією БК.

Отримані нами результати свідчать також про наявність порушень осморегуляторної функції нирок, що збігається з раніше виявленими пошкодженнями нирок. Так, як видно із табл. 2, показники фільтраційної фракції та екскреції ОАР у щурів 2-ї групи мали тенденцію до зниження відповідно до контрольних значень. Крім того, спостері-

галася зниження цих показників у щурів 1-ї групи. Також практично не змінювалася реабсорбція води та фракція осмотично вільної води на фоні незначного зниження кліренсу осмотично вільної води у щурів, яким вводили БК, що вказує на деяке порушення осмотичного розведення сечі (транспорту води), що відбувається у петлі Генле та збиральних трубочках нирки. Слід відмітити, що виведення ОАР на одиницю КФ збільшувалось у 3 рази у щурів 2-ї групи відносно контролю на фоні зниження екскреції ОАР на одиницю екскреції креатиніну у тварин обох груп. Також зменшувався індекс осмотичного концентрування сечі (U_{osm}/P_{osm}) цих щурів, що відповідає зменшенню реабсорбції води як у проксимальних, так і у дистальних канальцях. У цілому, реабсорбція ОАР та їх виведення у щурів 2-ї групи мали тенденцію до зниження порівняно з контролем та значеннями у тварин 1-ї групи. Цікавим є той факт, що кліренс осмотично вільної води був зменшеним у тварин обох груп і значення були майже однаковими (у щурів 2-ї групи дещо вищі). При цьому, як видно із вищеведеного, у щурів, яким вводили лише гентаміцин, виявлено значне порушення виведення води та ОАР із організму.

Нами виявлено у щурів 2-ї групи порівняно з контролем і тваринами 1-ї групи суттєве збільшення концентраційного індексу креатиніну (U_{Cr}/P_{Cr}) та запропонованого нами показника $(U_{Cr}/P_{Cr})/(U_{osm}/P_{osm})$, який „відокремлює” процеси концентрування на рівні проксимального канальця від загального концентрування сечі і, таким чином, ще раз підтверджує позитивний вплив БК на процеси канальцевої реабсорбції.

Отримані результати щодо дії БК як енергетичного субстрату в умовах пошкодження клітин нирок на прикладі гентаміцинової нефропатії свідчать про позитивний вплив даного препарату на динаміку ниркових функцій у цілому і, особливо, на стан реабсорбції у проксимальних канальцях, що проявляється у зменшенні показників

Таблиця 2. Вплив гентаміцину та бурштинової кислоти на процеси клубочкової фільтрації і канальцевої реабсорбції у білих щурів за умов індукованого водного діурезу ($M \pm m$; $n = 10$)

Показник	Контроль	Введення гентаміцину (1-ша група)	Введення гентаміцину і бурштинової кислоти (2-га група)
Кліренс креатиніну, мл/год	30,41±0,35	2,46±0,34 P<0,001	10,63±0,37 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Кліренс креатиніну, мкл · хв ⁻¹ · 100 г ⁻¹	228,10±17,00	45,20±2,44 P<0,001	88,61±11,30 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Фільтраційна фракція, мосмоль/хв/л	6,81±0,61	0,78±0,04 P<0,001	5,11±1,64 P ₂ <0,02
Екскреція осмотично активних речовин, мосмоль/год	0,19±0,04	0,10±0,005	0,12±0,01
Реабсорбція осмотично активних речовин, мосмоль/год	6,62±0,47	0,68±0,04 P<0,001	4,99±1,63 P ₂ <0,02
Реабсорбція осмотично активних речовин, %	97,83±0,47	87,06±0,43 P<0,001	96,22±0,72 P ₂ <0,001
Екскреція осмотично активних речовин, %	2,17±0,47	12,94±0,43 P<0,001	3,78±0,72 P ₂ <0,001
Кліренс осмотично активних речовин, мл/год	0,60±0,002	0,35±0,02 P<0,001	0,38±0,04 P ₁ <0,001
Реабсорбція води, %	94,32±0,21	80,08±0,43 P<0,001	91,03±1,51 P ₂ <0,001
Екскретована фракція води, %	5,68±0,21	19,92±0,43 P<0,001	8,97±1,51 P ₂ <0,001
Кліренс осмотично вільної води, мл/год	1,06±0,01	0,19±0,02 P<0,001	0,65±0,10 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Фракція осмотично вільної води, %	67,27±0,63	34,95±1,22 P<0,001	63,80±4,87 P ₂ <0,001
Екскреція білка/екскреція креатиніну, Од	0,019±0,003	0,56±0,02 P<0,001	0,11±0,05 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Екскреція білка/кліренс креатиніну, мкмоль/мл клубочкової фільтрації	(9,78±0,81) · 10 ⁻³	0,10±0,002 P<0,001	(27,79±7,03) · 10 ⁻³ P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
Екскреція осмотично активних речовин/екскреція креатиніну, Од	0,103±0,008	0,20±0,006 P<0,001	0,07±0,007 P ₁ <0,01 P ₂ <0,001
Екскреція осмотично активних речовин / кліренс креатиніну, мкмоль/мл клубочкової фільтрації	(3,18±0,26) · 10 ⁻³	0,04±0,001 P<0,001	(11,17±2,14) · 10 ⁻³ P ₁ <0,001 P ₂ <0,001

протеїнурії. Вторинно спостерігається нормалізація КФ, яка залежить від ступеня пошкодження нефрону, що в свою чергу призводить до зменшення азотемії та інших проявів гострої ниркової недостатності. Усе вищенаведене дає змогу рекомендувати використання БК для корекції порушених ниркових функцій у клінічній практиці при токсичних нефропатіях, індукованих гентаміцином та, можливо, іншими антибіотиками.

A.I. Gozhenko, M.P. Vladimirova, E.A. Topor

THE EFFECT OF AN AMBER ACID ON THE WHITE RATS KIDNEY FUNCTION UNDER GENTAMYCIN-INDUCED NEPHROPATHY

The amber acid neutralized by 10 % solution of NaOH in a concentration of 250 mmol/L was administered subcutaneously simultaneously with intraperitoneal injection of gentamycin in a dose of 10 mg/kg_{bw} once a day during 7 days to the ten nonlinear white male rats, weight 100-120 g exposed to the water-induced diuresis. In these experiments the positive action of an amber acid as energy substratum on some renal function tests was shown: improvement of reabsorption in proximal tubules, proved by proteinuria decrease, subsequent normalization of glomerular filtrations followed by uremia reduction and diminishing of other signs of acute renal failure.

Ukrainian scientific - research Institute of medicine of transport, Odesa

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Берязняков И.Г. Клинико-фармакологическая характеристика аминогликозидов (лекция) // Клин. антибиотикотерапия. – 2002. – № 5(19). – С. 18–24.
2. Вікторов О.П., Коваленко В.У., Логінов І.О., Яйченя В.П. Побічна дія антибіотиків аміноглікозидів: гентаміцин // Совр. проблемы токсикологии. – 2002. – №3. – С.72–76.
3. Владимірова М.П. Механізми пошкодження і компенсації почек при гентаміцинової нефропатії. – В кн.: Матеріали наукової конф. „IV – читання ім. В.В. Підвисоцького”: Тези доп. – Одеса, 2005. – С.29.
4. Владимірова М.П., Топор О.А., Савицький І.В. Вплив бурштинової кислоти на енергетичний обмін нирок білих щурів при експериментальній сулемовій

- нефропатії // Клін. та експерим. патологія. (IV нац. конгрес патофізіологів України з міжнарод. участю. – 2004. – Т. III, №2, Ч.2. – 364–368.
5. Возіанов О.Ф., Гоженко А.І., Федорук О.С. Гостра ниркова недостатність. – Одеса: Вид-во Одесь. держ. мед. ун-ту, 2003. – 376 с.
6. Гоженко А.И. Энергетическое обеспечение основных почечных функций и процессов в норме и при повреждении почек: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – К., 1987. – 37 с.
7. Ершова С.А. Дисфункция митохондрий у детей (обзор литературы) // Нефрология и диализ. – 2003. – 5, №4. – С.344–353.
8. Коваленко А., Белякова Н., Романцов М. и др. Фармакологическая активность янтарной кислоты и ее лекарственные формы // Врач. – 2000. – №4. – С.26–27.
9. Олійник С.А. До механізму мембранотропної, антиоксидантної та антиоксидантної дії натрію сукцинату // Совр. проблемы токсикологии. – 2001. – №3. – С.24–26.
10. Наточин Ю.В. Физиология почки: формулы и расчеты. – Л.: Наука, 1974. – 59 с.
11. Потапова А.В., Дзгоева Ф.У., Кутырина И.М. и др. Тубулоинтерстициальные нарушения при нефротоксическом действии антибиотиков // Урология и нефрология. – 1995. – №3. – С.11–14.
12. Яковлева О.А., Царук В.В. Механизмы нефротоксичности антибиотиков // Укр. хіміотерап. журн. – 2000. – №4(8). – С.66–71.
13. Appel G. B. Aminoglycoside nephrotoxicity // Amer. J. Med. – 1990. – 88, №3. – P. 16–20.
14. Begg E.J., Barclay M.L. Aminoglycosides: 50 years // Brit. J. Clin. Pharmacol. – 1995. – 39. – P. 597–603.
15. Hishida A., Nakajima T., Yamada M. et al. Roles of hemodynamic and tubular factors in gentamicin-mediated nephropathy // Ren. Fail. – 1994. – 16(1). – P. 109–116.
16. E.M. Hosaka, O.F.P. Santos, A.C. Seguro and M.F.F. Vattimo Effect of cyclooxygenase inhibitors on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2004. – 37(7). – P. 979–985.
17. Martinez-Salgado Carlos, Nelida Eleno, Ana I. Morales et al. Gentamicin treatment induces simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats // Kydney International. – 2004. – 65. – P. 2161–2171.
18. Mingeot-Leclercq M., Tulkens P.M. Aminoglycosides: nephrotoxicity // Antimicrob. Agents Chemother. – 1999. – 43. – P. 1003–1012.
19. Walker P.D., Barri Y., Sbab S.V. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity // Source Ren Fail. – 1999. – 21(3-4). – P. 433–442.

Укр. наук-досл. ін-т медицини транспорту МОЗ України, Одеса

Матеріал надійшов до редакції 31.10.2005