

616.61-0089-092.18:612.014.2:615.332.06.099]-092.9

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ НАРУШЕНИЯМИ СТРОЕНИЯ, МЕТАБОЛИЗМА И ФУНКЦИИ ПОЧЕК КРЫС С ИНТОКСИКАЦИЕЙ ГЕНТАМИЦИНОМ. ЧАСТЬ 2. ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ*

О.А. Борисенок, С.М. Зиматкин, Т.В. Бушма, О.В. Барабан, М.И. Бушма
УО "Гродненский государственный медицинский университет", Гродно, Беларусь

В механизме нарушения функции почек крыс гентамицином важную роль играет повреждение проксимальных извитых канальцев корковых нефронов. На биохимическом уровне (согласно результатам гистохимических исследований активности ферментов) это проявляется торможением внутриклеточного метаболизма (особенно энергетического обмена), реабсорбции глюкозы, белков и других метаболитов. В итоге снижается процесс мочеобразования. Снижение гентамицином функции клубочков (судя по уменьшению экскреции креатинина) прямо коррелирует с торможением метаболизма в канальцах (судя по ингибированию активности лактатдегидрогеназы, щелочной и кислой фосфатаз).

Ключевые слова: крысы, гентамицин, нефропатия, функция почек и метаболизм в нефронах.

Введение. Аминогликозидные антибиотики используются для лечения инфекционных заболеваний, вызванных аэробными грамотрицательными палочками [11]. Однако их широкое применение ограничено развитием тяжелой нефропатии (\approx у каждого четвертого больного) [7]. Последняя обусловлена накоплением аминогликозидов в эпителии проксимальных извитых канальцев (ПИК), генерацией свободных радикалов кислорода и развитием цитотоксичности [15].

В настоящем исследовании предпринята попытка оценить взаимосвязь между некоторыми показателями метаболизма в нефронах и нарушением функции почек у крыс с интоксикацией гентамицином.

Материалы и методы. Опыты проведены на 16 беспородных крысах-самках массой 250 - 300 г. Поражение почек вызывали путем ежедневного внутрибрюшинного введения гентамицина в течение 10 дней в дозе 60 мг/кг/день [14]. Контрольным крысам инъецировали воду для инъекций. Через 2 часа после последнего введения веществ крыс помещали в обменные клетки для сбора мочи в течение 24 часов. Затем животных эвтаназировали, собирали кровь и извлекали почки для проведения исследований.

Методы оценки характера и степени выраженности нарушений метаболизма в почках

Структурно-функциональная гетерогенность различных отделов нефронов явилась основанием для выбора гистохимических методов исследований как основных при оценке метаболизма в них. С этой целью кусочки почек фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали на выявление содержания рибонуклеопротеинов (РНП) и гликопротеинов (ГП), а после фиксации в ацетоне - на определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ). Другие кусочки почек замораживали в жидком азоте, готовили срезы в криостате и окрашивали на изучение активности кислой фосфатазы (КФ), лактат- и сукцинатдегидрогеназ (ЛДГ, СДГ) [8].

РНП являются маркерами интенсивности процессов биосинтеза белков клетками для собственных нужд [2]. ГП - структурные компоненты гликокаликса клеточных мембран [3]. ЩФ является маркерным ферментом щеточной каемки и свидетельствует об интенсивности процессов реабсорбции глюкозы [1]. КФ катализирует отщепление неорганического фосфата от фосфорных эфиров и участвует в реабсорбции белков [6]. ЛДГ катализирует перенос восстановленного эквивалента от лактата на

НАД+ или от НАДН на пируват, окисляет α -гидроксикислоты и восстанавливает α -кислоты [12, 13]. Кроме того, от ее активности зависит синтез АТФ в анаэробных условиях [6]. СДГ играет ключевую роль в энергетическом обмене [5, 10]. При повышенных энергозатратах фермент является основным звеном энергообеспечения клеток [10]. Участвует в активной реабсорбции Na^+ , K^+ , Ca^{++} , что ассоциируется с синхронным пассивным обратным всасыванием воды [1]. Фермент катализирует реакцию: сукцинат + убинон \rightleftharpoons фумарат + убинон H_2 . Выполняет важную роль в передаче электронов и протонов от ФАДН₂ в митохондриальную дыхательную цепь [5].

Изучение гистологических препаратов, микрофотографирование проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокамеры (Leca DFC 320, Германия), а также программы анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). В каждой экспериментальной группе оценивали не менее 120 - 150 структур, что обеспечивало достаточный объем выборки для последующего анализа.

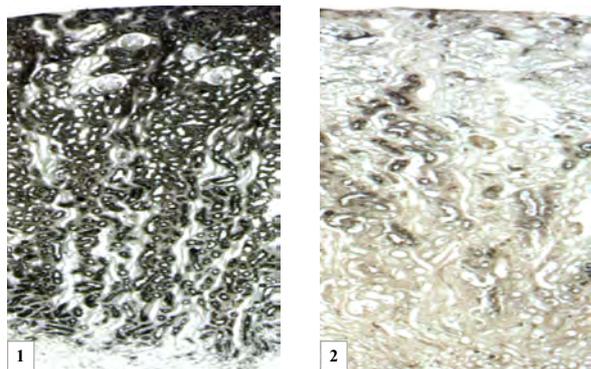
Методы оценки характера и степени выраженности нарушений функции почек

О характере и степени выраженности нарушений функции почек у крыс с интоксикацией гентамицином судили на основании результатов исследования плазмы и мочи. В плазме определяли содержание средних молекул, мочевины и креатинина, а в моче - мочевины, креатинина, белка, глюкозы, лейкоцитов, эритроцитов. Кроме того, оценивали клиренс креатинина, рН, удельный вес с использованием широко применяемых в клинической практике методов исследований [4].

Количественную оценку полученных результатов проводили с использованием методов математического моделирования: непараметрическая статистика - критерий Манна-Уитни, корреляционный анализ по Спирмену [9].

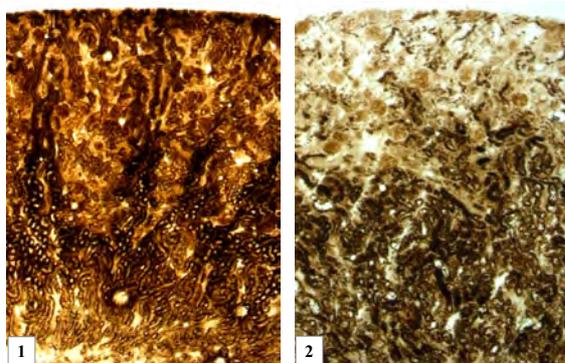
Результаты и обсуждение. Среднее содержание РНП в ПИК корковых нефронов (КН) не изменяется, а ГП - резко снижается. Активность ЩФ снижается в КН и юкстамедуллярных нефронах (ЮН), соответственно, на 67 % и 44 %, вплоть до полного исчезновения в отдельных КН. Активность КФ и ЛДГ уменьшается в ПИК КН (соответственно на 65 % и 35 %), а СДГ - в ПИК КН (на 69 %) и ЮН (на 56 %) (рис. 1, 2).

*Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда Фундаментальных исследований при СМ РБ (грант Б09-011).



1 – Вода (интактные), высокая активность фермента в щёточной кайме ПИК; 2 – гентамицин, резкое снижение активности фермента. Ч 25. Окраска по Гомори. Микрофотография

Рисунок 1 – Активность щелочной фосфатазы в корковом веществе почек крыс



1 – Вода (интактные), высокая активность фермента; 2 – гентамицин, средняя активность фермента снижена в ПИК КН, в ЮН – не изменена. Ч 25. Окраска по Гомори. Микрофотография

Рисунок 2 – Активность кислой фосфатазы в почках крыс

Содержание в плазме средних молекул, мочевины и креатинина под влиянием гентамицина возрастает на 32%, 279% и 182%, соответственно (табл. 1).

Увеличение в плазме содержания мочевины и креатинина ассоциируется с синхронным снижением их экскреции с мочой, соответственно на 44% и 73%. Клиренс креатинина уменьшается на 80%. Значения pH мочи снижаются на 20%. Содержание белка в моче повышается в 6 раз, а глюкозы и эритроцитов - не изменяется. В моче появляются лейкоциты (табл. 1).

Повышенное содержание в плазме крыс с интоксикацией гентамицином средних молекул обратно коррелирует со сниженной активностью ЩФ в ПИК КН и ЮН, а также КФ в ПИК КН. Аналогичные взаимосвязи выявлены для мочевины и креатинина. Исключение составляет появление отрицательных взаимосвязей с пониженной активностью ЛДГ в ПИК КН (табл. 2).

Сниженное содержание мочевины и креатинина в моче прямо коррелируют со сниженной активностью ЩФ в ПИК КН и ЮН, КФ и ЛДГ в ПИК КН. Сниженный клиренс креатинина прямо коррелирует с ингибированной активностью КФ в ПИК КН. Уменьшение pH мочи прямо коррелирует со сниженной активностью ЩФ в ПИК ЮН. Увеличение содержания в моче белка обратно коррелирует с ингибированием активности ЩФ в ПИК КН и ЮН, а также КФ в ПИК КН. Аналогичные взаимосвязи выявлены и по отношению к повышенному содержанию лейкоцитов в моче. Исключение составляет отсутствие от-

рицательной взаимосвязи с активностью ЩФ в ПИК ЮН (табл. 2).

Таблица 1 – Нарушение функции почек крыс, получавших гентамицин (внутрибрюшинно, 60 мг/кг, 1 раз в день, 10 дней). Ме (25%; 75%) – первая строка цифр. U (значение критерия Манна-Уитни), p (значение, соответствующее критерию) – вторая строка цифр

Исследуемые показатели	Вода (интактные)	Гентамицин
Плазма		
Средние молекулы (ед)	0,28 (0,23; 0,31)	0,37 (0,35; 0,48) 2,00 (0,001)
Мочевина (ммоль/л)	8,00 (6,75; 8,65)	30,30 (25,30; 34,00) 0,00 (0,0004)
Креатинин (мкмоль/л)	77,50 (73,00; 81,00)	218,50 (180,00; 289,00) 0,00 (0,0004)
Моча		
Мочевина (моль/л)	0,39 (0,29; 0,96)	0,22 (0,14; 0,28) 5,00 (0,003)
Креатинин (ммоль/л)	7,30 (5,72; 9,21)	1,96 (1,65; 3,44) 4,00 (0,002)
Клиренс креатинина (мл/мин)	0,84 (0,31; 1,08)	0,17 (0,09; 0,48) 13,00 (0,03)
pH	6,25 (5,50; 7,00)	5,00 (5,00; 6,00) 16,00 (0,03)
Белок (г/л)	0,11 (0,05; 0,15)	0,78 (0,58; 1,61) 1,50 (0,001)
Лейкоциты (шт. в поле зрения)	0,00 (0,00; 0,50)	2,50 (0,00; 4,00) 15,00 (0,03)

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) различия

Таблица 2 – Коэффициенты корреляции между показателями метаболизма в нефронах и функцией почек у крыс с гентамициновой (внутрибрюшинно, 60 мг/кг, 1 раз в день, 10 дней) нефропатией

Активности ферментов	Показатели функции почек								
	Плазма				Моча				
	Средние молекулы (ед)	Мочевина (ммоль/л)	Креатинин (мкмоль/л)	Мочевина (ммоль/л)	Креатинин (ммоль/л)	Клиренс креатинина (мл/мин)	pH	Белок (г/л)	Лейкоциты (шт. в поле зрения)
ЩФ (ЕД ОП) в ПИК КН	-0,77	-0,79	-0,87	+0,65	+0,70	+0,43	+0,51	-0,77	-0,62
ЮН	-0,82	-0,68	-0,73	+0,59	+0,62	+0,50	+0,53	-0,67	-0,51
КФ (ЕД ОП) в ПИК КН	-0,81	-0,82	-0,79	+0,91	+0,93	+0,83	+0,30	-0,64	-0,59
ЛДГ (ЕД ОП) в ПИК КН	-0,35	-0,67	-0,76	+0,57	+0,67	+0,54	+0,46	-0,38	-0,28

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически значимые коэффициенты корреляции. Знаком «+» обозначена положительная взаимосвязь, знаком «-» – отрицательная. Приведены показатели, для которых выявлены статистически значимые различия. ЩФ – щелочная фосфатаза, ЕД ОП – единицы оптической плотности, ПИК – проксимальные извитые канальцы, КН – корковые нефроны, ЮН – юкстамедуллярные нефроны, КФ – кислая фосфатаза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа

Заключение

Анализируя результаты, полученные с использованием методов описательной статистики, можно прийти к следующему заключению. В механизме нарушения функции почек крыс гентамицином (альбуминурия, увеличение в плазме мочевины, креатинина, средних молекул; снижение клиренса креатинина, содержания в моче креатинина и мочевины) важную роль играет повреждение антибиотиком ПИК (преимущественно КН). Об этом свидетельствует: ингибирование реабсорбции глюкозы и других метаболитов (судя по снижению активности ЩФ), угнетение внутриклеточного метаболизма и реабсорбции белков (судя по снижению активности КФ), нарушение энергетического и водно-электролитного обменов (судя по снижению активности ЛДГ и СДГ).

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о наличии взаимосвязей между нарушениями процессов метаболизма в нефронах и функции почек. Осо-

бенно тесная взаимосвязь обнаружена между снижением экскреции креатинина и ингибированием энергозависимых процессов реабсорбции глюкозы и белков щеточной каемкой ПИК КН.

Литература

1. Афанасьев, Ю.И. Мочевыделительная система / Ю.И. Афанасьев [и др.] // Гистология, цитология, эмбриология / Под ред.: проф. Ю.И. Афанасьева, Н.А. Юриной. – М.: Медицина, 2002. – С. 656 – 673.
2. Бабаханян, Р.В. Гистохимические изменения проксимальных и дистальных канальцев почек при отравлении дихлорэтаном / Р.В. Бабаханян, С.Ф. Скрижинский, О.Д. Ягмуров // Нефрология. – 1998. – Т. 2, № 2. – С. 85–87.
3. Бойчук, Н.В. Клетка / Н.В. Бойчук [и др.] // Гистология. Учебник. 2-е изд., перераб. и доп. / Под ред.: Э.Г. Улумбекова, Ю.А. Чельшева. – М.: ГЭОТАР–МЕД, 2002. – С. 16.
4. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.С. Камышников. – 2-е изд. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
5. Кондрашева, М.Н. Янтарная кислота и янтарат-зависимая энергетика / М.Н. Кондрашева // Терапевтическое действие янтарной кислоты / М.Н. Кондрашева. – Пушино, 1976. – С. 221–224.
6. Кузьменкова, Л. В. Гистохимические изменения в почках при хроническом гломерулонефрите / Л.В. Кузьменкова // Врачебное дело. – 1973. – № 3. – С. 94–98.
7. Марино, П. Сведения об антибактериальных средствах /

- П. Марино // Интенсивная терапия: пер. с английского, доп. / П. Марино. – М: ГОЭТАР Медицина, 1999. – С. 573–577.
8. Пирс, Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Э. Пирс. – М.: «Иностранная литература», 1962. – 962 с.
9. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
10. Розанов, В.А. Надмолекулярная организация аминотрансфераз и дегидрогеназ б-кетокислот митохондрий головного мозга крыс / В.А. Розанов [и др.] // Укр. биохим. журн. – 1991. – Т. 63, № 2, С. 66–71.
11. Страчунский, Л.С. Аминогликозиды / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов // Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей / Л.С. Страчунский, С.Н. Козлов. – М.: Боргес, 2002. – С. 71–82, 287–96.
12. McQueen M.J. The reduction of hydroxypyruvate by human serum / M.J. McQueen, J. King // Enzyme. – 1971. – Vol. 12, № 5. – P. 523–528.
13. Plummer, D.T. Organ specificity and lactatedehydrogenase activity. 2. Some properties of human-heart and liver preparations / D.T. Plummer, J.H. Wilkinson // Biochem. J. – 1963. – Vol. 87. – P. 423–429.
14. Provoost, A.P. Nephrotoxicity of aminoglycosides in young and adult rats / A.P. Provoost, O. Adejuyigbe, E. D. Wolff // Pediatr. Res. – 1985. – Vol. 19, № 11. –P. 119 –1196.
15. Simmons, C.F. Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial oxidative phosphorylation / C.F. Simmons, R.T. Bogusky, H.D. Humes // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1980. – Vol. 214, № 3. – P. 709–715.

INTERRELATIONS BETWEEN DISTURBANCES OF THE STRUCTURE, METABOLISM AND FUNCTION OF RATS KIDNEYS WITH GENTAMYCIN INTOXICATION PART 2. FUNCTIONAL AND METABOLIC INTERRELATIONS

O.A. Borisenok, S.M. Zimatkin, T.B. Bushma, O.V. Baraban, M.I. Bushma
Educational Institution «Grodno State Medical University», Grodno, Belarus

It well known that damage of rats kidneys by gentamicin is located in proximal convoluted tubules cortical nephrons. At biochemical level (according to results of histochemical probes of enzymes activity) it revealed by inhibition of endocellular metabolism (especially energy exchange), reabsorptions of glucose, proteins and other metabolites. As a result the uriniformation process decreases. The decreasing by gentamicin of glomerulus function (judging by inhibition of creatinine excretion) directly correlates with inhibition of metabolism in tubules (judging by decreasing of the activity of lactatedehydrogenase, alkaline and acid phosphatases).

Key words: rats, gentamicin, nephropathy, function of kidneys and structure of nephrons.

Адрес для корреспонденции: e-mail: pharma@grsmu.by

Поступила 21.05.2012