

ВЗАИМОСВЯЗИ МЕЖДУ НАРУШЕНИЯМИ СТРОЕНИЯ, МЕТАБОЛИЗМА И ФУНКЦИИ ПОЧЕК КРЫС С ИНТОКСИКАЦИЕЙ ГЕНТАМИЦИНОМ

ЧАСТЬ 1. СТРУКТУРНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ

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

Установлено, что вызванные гентамицином нарушения строения нефронов взаимосвязаны с ингибированием в них процессов метаболизма. По степени взаимосвязи показатели последнего располагаются в следующем убывающем ряду: лактатдегидрогеназа в проксимальных извитых канальцах (ПИК) корковых нефронов (КН) > щелочная фосфатаза в ПИК КН = кислая фосфатаза в ПИК юкстамедуллярных нефронах > кислая фосфатаза в ПИК КН = рибонуклеопротеины. Важнейшие метаболические нарушения в почках, вызванные гентамицином, регистрируются в ПИК КН и заключаются в ингибировании процессов энергетического обмена (судя по снижению активности лактатдегидрогеназы).

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

Введение

Гентамицин - высокоэффективный аминогликозидный антибиотик, применяемый при тяжелых инфекционных заболеваниях (сепсис и др.), вызываемых грамотрицательными микроорганизмами [11]. Его широкое применение в значительной степени ограничивается развитием нефропатии (□ в 25 % случаев) разной степени выраженности [6].

В механизме развития поражения почек гентамицином играет роль его накопление в эпителии проксимальных извитых канальцев (ПИК), преимущественно корковых нефронов (КН). Следствием этого является нарушение функции митохондрий и генерация цитотоксичных радикалов кислорода [15].

Характер морфологических, гистохимических и функциональных нарушений в почках при гентамициновой нефропатии хорошо изучен. Однако в доступной литературе отсутствуют результаты исследований, посвященные оценке взаимосвязей между ними.

В этой части работы предпринята попытка установить взаимосвязи между нарушениями структуры нефронов и процессов метаболизма в них у крыс с интоксикацией гентамицином.

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

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. Затем животных эвтаназировали и извлекали почки для проведения исследований.

I. Методы оценки характера и степени выраженности нарушений гентамицином строения почек

Кусочки почек фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Срезы толщиной 10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином [7].

Оценивали степень повреждения ПИК КН: 1) нормальные канальцы; 2) умеренно поврежденные - канальцы с сохранившимися призматическими эпителиоцитами и щеточной каёмкой на их апикальной части; 3) сильно поврежденные - канальцы с эпителиоцитами, лишёнными щеточной каёмки, кубической формы, часто с повышенной базофилией цитоплазмы, иногда гипертрофированными, с фигурами митоза; 4) погибшие - канальцы

резко расширенные, со сдавленным, уплощённым эпителием, напоминающим эндотелий, или резко расширенные, лишённые эпителия, с сохранением только базальной мембраны либо прослойки соединительной ткани вокруг канальца.

Определяли размеры ПИК КН (наружный и внутренний диаметры, высоту выстилающих их эпителиоцитов), а также количество канальцев, заполненных детритом (ПИК КН и юкстамедуллярных нефронов (ЮН), прямых канальцев КН и ЮН).

II. Методы оценки характера и степени выраженности нарушений гентамицином метаболизма в почках

Особенностью почек является неоднородность структурных единиц (КН и ЮН), их специализация (секреция ренина - только ЮН), многообразие популяций клеток и выполняемых ими функций: клубочки - фильтрация плазмы; ПИК - секреция метаболитов, не прошедших через "фильтр" (например секреторная система органических кислот), реабсорбция органических водорастворимых молекул (например глюкозы); петля Генле и дистальные извитые канальцы - реабсорбция электролитов; собирательные трубочки - реабсорбция воды). Следовательно, для оценки процессов метаболизма в этом органе стандартные методы биохимических исследований (в общем гомогенате ткани, субклеточных фракциях всех клеток) малоинформативны.

Вышеизложенные обстоятельства явились основанием для выбора гистохимических методов оценки важнейших показателей метаболизма (содержание рибонуклеопротеинов и гликопротеидов; активности щелочной и кислой фосфатаз, лактат- и сукцинатдегидрогеназ) в разных отделах нефронов.

Рибонуклеопротеины (РНП). Их количество свидетельствует о интенсивности процесса синтеза белков клетками для собственных нужд [2].

Гликопротеиды (ГП). Являются важным структурным компонентом гликокаликса клеточных мембран, входят в состав базальных мембран эпителия [3].

Щелочная фосфатаза (ЩФ). Маркерный фермент щеточной каёмки. Участвует в реабсорбции глюкозы [1].

Кислая фосфатаза (КФ). Локализуется в лизосомах и катализирует отщепление неорганического фосфата от фосфорных эфиров. Участвует в реабсорбции белков [5].

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ). Локализована в цитозоле и катализирует перенос восстановленного эквивалента от лактата на НАД⁺ или от НАДН на пируват. Окис-

ляет ряд \square -гидроксикислот и восстанавливает некоторые \square -кислоты [12; 13]. Обеспечивает синтез АТФ в анаэробных условиях без участия митохондриальной дыхательной цепи [5].

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Локализована в митохондриях и играет ключевую роль в энергетическом обмене [4; 10]. Катализирует реакцию: сукцинат + убинон → фумарат + убинон H_2 . Выполняет важную роль в передаче электронов и протонов от ФАДН₂, входящего в ее состав, в митохондриальную дыхательную цепь [4]. При повышенных энергозатратах фермент является основным в энергообеспечении клеток [10]. Участвует в активной реабсорбции Na^+ , K^+ , Ca^{++} , что ассоциируется с синхронным пассивным обратным всасыванием воды [1].

Для гистохимических исследований кусочки почек фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали на выявление содержания РНП и ГП, а после фиксации в ацетоне, - и на активность ЩЦФ. Другие кусочки почек замораживали в жидком азоте, готовили срезы в криостате и окрашивали на выявление активности КФ, ЛДГ, СДГ и выражали в единицах оптической плотности (ЕД ОП) [8].

Изучение гистологических препаратов, микрофотографирование, морфометрию 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.

Количественную оценку результатов морфологических и гистохимических исследований проводили с использованием методов математического моделирования: непараметрическая статистика (критерий Манна-Уитни); корреляционный анализ по Спирмену [9].

Результаты исследований

Введение крысам гентамицина (внутрибрюшинно, 60 мг/кг, 1 раз в день, 10 дней) сопровождается развитием тяжелой нефропатии. Это проявляется в отсутствии нормальных ПИК КН. Количество умеренно поврежденных ПИК КН возрастает в 2,6 раза. Преобладают сильно поврежденные (41%) и погибшие (40%) ПИК КН. Отторжение щеточной каемки ПИК КН или их клеток приводит к закупорке клеточным детритом меньших по диаметру прямых канальцев. Следствием этого является увеличение давления мочи в ПИК КН и вторичное их механическое повреждение. Об этом свидетельствует увеличение наружного и внутреннего диаметра ПИК КН, а также снижение высоты выстилающих их эпителиоцитов, соответственно, на 7%, 527% и 62% (табл. 1).

В ЮН деструктивные изменения значительно менее выражены. Так, в области почечных колонок почти не встречаются ПИК с сильными повреждениями. Преобладают однотипные расширенные канальцы, заполненные гомогенным оксифильным детритом (остатки щеточной каемки). Эпителиоциты, выстилающие их просвет, не сдавлены и не уплощены в такой степени, как в КН. Они остаются кубическими.

Клеточный детрит, вероятно, содержит большое количество гликопротеинов гликокаликса щеточной каемки. Количество ПИК КН и ЮН, прямых канальцев КН и

ЮН, заполненных им, составляет соответственно 27%, 32% и 36 %.

Таблица 1 - Структурные изменения в почках 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

Изучаемые показатели	Вода (интактные)	Гентамицин
Степень поражения ПИК КН (%): нормальные	95,5 (92,5; 96,0)	0,0 (0,0; 0,0) 0,00 (0,001)
умеренно повреждённые	4,5 (4,0; 7,5)	16,0 (6,5; 39,0) 9,00 (0,016)
сильно повреждённые	0,0 (0,0; 0,0)	40,5 (34,5; 48,0) 0,00 (0,001)
погибшие	0,0 (0,0; 0,0)	40,0 (20,5; 56,5) 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)
внутренний диаметр	3,38 (2,75; 4,38)	21,20 (19,30; 23,77) 0,00 (0,001)
высота эпителиоцитов	12,81 (12,53; 13,41)	4,93 (4,34; 5,79) 0,00 (0,001)
Канальцы, заполненные детритом (%): ПИК КН	0,0 (0,0; 0,0)	27,0 (24,0; 31,0) 0,00 (0,00)
ПИК ЮН	0,0 (0,0; 0,0)	32,0 (20,5; 35,5) 0,00 (0,001)
прямые КН и ЮН	0,0 (0,0; 0,0)	35,5 (32,0; 42,5) 0,00 (0,001)

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) различия. ПИК - проксимальные извитые канальцы, КН - корковые нефроны, ЮН - юкстамедуллярные нефроны.

В строме почек развиваются реактивные изменения. Вблизи поврежденных ПИК они выражаются в расширении вен и капилляров, выраженной очаговой лейкоцитарной и гистиоцитарной инфильтрации.

Морфологические проявления нефротоксического действия гентамицина подтверждаются также результатами гистохимических исследований. Среднее содержание РНП во всех ПИК КН не изменяется. Однако при анализе их содержания в канальцах с различной степенью повреждения выявлены существенные различия. В эпителии ПИК КН с умеренными повреждениями оно снижено. По мере нарастания степени повреждения канальцев содержание РНП повышается. Это может быть связано со сдавливанием эпителиальных клеток в результате закупорки канальцев клеточным детритом.

Содержание ГП резко снижено, вплоть до их полного исчезновения в щеточной каемке ПИК, особенно КН. Они регистрируются в просвете лишь отдельных ПИК КН. Их гораздо больше в ПИК ЮН, прямых канальцах и собирательных трубочках. Это подтверждается присутствием в них остатков гликокаликса щеточной каемки, отторгнувшейся от эпителия ПИК.

Активность ЩЦФ снижена в КН и ЮН, соответственно на 67 и 44%, вплоть до полного исчезновения в отдельных КН (табл. 2). Это свидетельствует о гибели и отторжении их щеточной каемки. Остаточная активность иногда выявляется в клеточном детрите, заполняющем просвет канальцев, особенно в области почечных колонок, где расположены ПИК ЮН. Там детрит остается на месте.

Активность КФ в погибших эпителиоцитах ПИК КН резко снижена, а в сохранившихся - повышена. Поэтому средние значения показателя в ПИК КН снижены на 65%, а в ЮН - не изменены (табл. 2).

Активность ЛДГ снижена в ПИК КН на 35% (табл. 2).

Активность СДГ резко снижена, вплоть до полного исчезновения в эпителии ПИК большинства КН и ЮН, соответственно, на 69 и 56% (табл. 2).

Таблица 2 - Метаболические изменения в почках 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

Исследуемые показатели	Вода (интактные)	Гентамицин
ЩФ (ЕД ОП) в ПИК КН,	0,54 (0,50; 0,56)	0,18 (0,15; 0,21) 0,00 (0,001)
ЮН.	0,50 (0,35; 0,52)	0,28 (0,21; 0,34) 4,00 (0,005)
КФ (ЕД ОП) в ПИК КН	0,62 (0,58; 0,74)	0,22 (0,13; 0,45) 0,00 (0,001)
ЛДГ (ЕД ОП) в ПИК КН	0,26 (0,18; 0,27)	0,17 (0,12; 0,19) 7,00 (0,025)
СДГ (ЕД ОП) в ПИК: КН,	0,61 (0,51; 0,65)	0,19 (0,18; 0,21) 0,00 (0,00)
ЮН.	0,43 (0,31; 0,49)	0,19 (0,16; 0,19) 0,00 (0,00)

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) различия. ЩФ - щелочная фосфатаза, ЕД ОП - единицы оптической плотности, ПИК - проксимальные извитые канальцы, КН - корковые нефроны, ЮН - юкстамедуллярные нефроны, КФ - кислая фосфатаза, ЛДГ - лактатдегидрогеназа, СДГ - сукцинатдегидрогеназа.

Результаты корреляционного анализа по Спирмену свидетельствуют о том, что между строением нефронов крыс, получавших гентамицин, и метаболизмом в них существует тесная взаимосвязь.

Содержание РНП положительно коррелирует с наружным диаметром ПИК КН. Активность ЩФ в ПИК КН (но не в ЮН) прямо коррелирует с количеством умеренно поврежденных ПИК КН и обратно - с процентом погибших канальцев. Активность КФ в ПИК КН и ЮН обратно коррелирует с количеством ПИК КН и ЮН, заполненных детритом. Активность ЛДГ в ПИК КН обратно коррелирует с количеством сильно поврежденных ПИК КН, наружным и внутренним диаметром ПИК КН (табл. 3).

Таблица 3 - Коэффициенты корреляции между показателями строения нефронов и метаболизмом в них у крыс с гентамициновой (внутрибрюшинно, 60 мг/кг, 1 раз в день, 10 дней) нефропатией

Морфологические показатели в почках	Показатели метаболизма почек				
	РНП	ЩФ (ЕД ОП) в ПИК КН	КФ (ЕД ОП) в ПИК КН	КФ (ЕД ОП) в ПИК ЮН	ЛДГ (ЕД ОП) в ПИК КН
Степень поражения ПИК КН (%): умеренно поврежденные,	-0,24	+0,81	+0,55	+0,38	+0,57
сильно поврежденные,	+0,43	-0,38	-0,55	-0,40	-0,86
погибшие.	+0,17	-0,71	-0,60	-0,57	-0,18
Размеры ПИК КН (мкм): наружный диаметр,	+0,86	-0,36	-0,14	-0,07	-0,93
внутренний диаметр.	+0,45	-0,59	-0,62	-0,24	-0,82
Канальцы, заполненные детритом (%): ПИК КН,	+0,47	-0,40	-0,77	-0,81	-0,25
ПИК ЮН.	+0,45	-0,55	-0,52	-0,81	-0,14

Примечание: полужирным шрифтом выделены статистически значимые коэффициенты корреляции. Знаком "+" обозначена положительная взаимосвязь, знаком "-" - отрицательная. ПИК - проксимальные извитые канальцы, КН - корковые нефроны, ЮН - юкстамедуллярные нефроны, РНП - рибонуклеопротеины, ЩФ - щелочная фосфатаза, ЕД ОП - единицы оптической плотности, КФ - кислая фосфатаза, ЛДГ - лактатдегидрогеназа.

Заключение

Результаты корреляционного анализа свидетельствуют о том, что вызванные гентамицином повреждения нефронов взаимосвязаны с нарушениями в них процессов метаболизма. По степени взаимосвязи показатели располагаются в следующем убывающем ряду: ЛДГ в ПИК КН > ЩФ в ПИК КН = КФ в ПИК ЮН > КФ в ПИК КН = РНП. Таким образом, основной "биохимической мишенью" действия гентамицина является ЛДГ. Ингибирование антибиотиком активности этого фермента свидетельствует о торможении гентамицином энергетического обмена в ПИК КН.

Литература

- 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.
- 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.
- 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.
- Кондрашева, М.Н. Янтарная кислота и янтарат-зависимая энергетика / М.Н. Кондрашева // Терапевтическое действие янтарной кислоты / М.Н. Кондрашева. - Пушино, 1976. - С. 221-224.
- Кузьменкова, Л. В. Гистохимические изменения в почках при хроническом гломерулонефрите / Л.В. Кузьменкова // Врачебное дело. - 1973. - № 3. - С. 94-98.
- Марино, П. Сведения об антибактериальных средствах / П. Марино // Интенсивная терапия: пер. с английского, доп. / П. Марино. - М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. - С. 573-577.
- Можейко, Л.А. Классические методы окраски в гистологии / Л.А. Можейко // Методы исследования в гистологии / Под ред.: С.М. Зиматкин. - Гродно: ГрГМУ, 2010. - С. 23-34.
- Пирс, Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная) / Э. Пирс. - М.: "Иностранная литература", 1962. - 962 с.
- Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. / О.Ю. Реброва. - М.: МедиаСфера, 2002. - 312 с.
- Розанов, В.А. Надмолекулярная организация аминотрансфераз и дегидрогеназ α -кетокислот митохондрий головного мозга крыс / В.А. Розанов [и др.] // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, № 2, С. 66-71.
- 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.
- McQueen M.J. The reduction of hydroxyurate by human serum / M.J. McQueen, J. King // Enzyme. - 1971. - Vol. 12, № 5. - P. 523-528.
- Plummer, D.T. Organ specificity and lactate dehydrogenase 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. 1191 -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 STRUCTURE, METABOLISM AND FUNCTION OF RATS KIDNEYS AT GENTAMYCIN INTOXICATION

PART 1. STRUCTURAL AND METABOLIC INTERRELATIONS

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

Educational Establishment "Grodno State Medical University", Grodno, Belarus

It has been established that gentamycin-induced disturbances in nephron structure are associated with the inhibition of metabolism processes in them. According to the degree of interaction the indicators of metabolism are descending as follows: lactatdehydrogenase in proximal convoluted tubules (PCT) of cortical nephrons (CN) > alkaline phosphatase in PCT of CN = acid phosphatase in PCT of juxtamedullary nephrons > acid phosphatase in PCT of CN = ribonucleoproteins. The main gentamycin-induced metabolic disturbances in the kidneys are registered in PCT of CN and involve the inhibition of energetic exchange processes (according to the decrease in lactatdehydrogenase activity).

Key words: rats, gentamycin, nephropathy, structure of kidneys, metabolism in nephrons.

Поступила 21.05.12