

© А.И.Гоженко, М.П.Владимирова, Е.А.Топор, 2005
УДК 616.61.001.5-092:615.332

А.И. Гоженко, М.П. Владимирова, Е.А. Топор

РЕНАЛЬНЫЕ ДИСФУНКЦИИ У БЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ГЕНТАМИЦИНА

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

RENAL DYSFUNCTIONS IN WHITE RATS AFTER A SINGLE ADMINISTRATION OF GENTAMICIN

Кафедра общей и клинической патологической физиологии им. В.В. Подвысоцкого, кафедра семейной медицины Одесского государственного медицинского университета, Украинский научно-исследовательский институт медицины транспорта, Одесса, Украина

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучение функции почек белых крыс, механизмов и динамики их развития, определение дозо-зависимых токсических эффектов гентамицина (Г) после однократного введения препарата в условиях индуцированного водного диуреза. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Влияние Г на функцию почек изучено на 28 белых нелинейных крысах-самцах массой 160-180 г в условиях индуцированного водного диуреза через 2 часа после однократного внутривентриального введения препарата из расчета 10 мг/100 г массы тела и 20 мг/100 г массы тела. Определяли количество мочи, содержание в ней белка; концентрацию креатинина и осмоляльность мочи и плазмы крови. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Установлено, что введение крысам Г в дозе как 10 мг, так и 20 мг/100 г массы тела приводит уже в первые 2 часа к достоверному уменьшению диуреза, как в абсолютных, так и в относительных величинах, особенно после введения 20 мг. Обнаружено увеличение экскреции белка, причем нарастающее пропорционально дозе введенного препарата, при этом увеличиваются показатели удельной протеинурии действующими нефронами. Отмечено снижение скорости клубочковой фильтрации по клиренсу эндогенного креатинина, умеренное увеличение содержания креатинина плазмы крови. Показано уменьшение клиренса и фракции осмотически свободной воды при водном диурезе, нарушение максимального осмотического разведения мочи, свидетельствующие о нарушении осморегулирующей функции почек. Выявленная дисфункция позволяет расценивать ее как доказательства нефротоксичности Г при однократном введении. Причем, выявленные дисфункции могут быть результатом нарушения почечных процессов – клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Г, введенный в дозах 10 мг и 20 мг/100 г массы тела обладает нефротоксическим действием у крыс уже в первые два часа, что проявляется протеинурией, уменьшением диуреза и снижением скорости клубочковой фильтрации. С увеличением дозы Г до 20 мг/100 г массы тела возрастает протеинурия, что позволяет нефротоксический эффект препарата считать дозозависимым. Одновременно происходит нарушение осморегулирующей функции почек с уменьшением их способности к максимальному разведению мочи.

Ключевые слова: почки, гентамицин, диурез, протеинурия, клубочковая фильтрация, канальцевая реабсорбция, осморегулирующая функция.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study kidney functions in white rats, the mechanisms and dynamics of the development, determination of dose-dependent toxic effects of gentamicin (G) after a single administration of the drug under conditions of induced water diuresis. **MATERIAL AND METHODS.** The influence of G on the kidney function was studied in 28 white male rats with body mass 160-180 g under conditions of induced water diuresis in 2 hours after a single intraperitoneal injection of the drug in doses 10mg/100g body mass and 20 mg/100 g body mass. The amount of urine, content of protein in it, creatinine concentration and osmolality of urine and blood plasma were determined. **RESULTS.** It was found that injection of G to rats in dose of both 10 mg and 20 mg/100 g of body mass resulted in a reliable decrease of diuresis as early as within 2 hours both in the absolute and relative values, especially after injection of 20 mg. Excretion of protein was noted to increase proportionally to the dose of the drug injected, the indices of specific proteinuria by the acting nephrons being increased. The decreased glomerular filtration rate by clearance of endogenous creatinine, moderately increased content of blood plasma creatinine were noted. Clearance and fraction of osmotically free water in water diuresis, impairment of maximal osmotic dilution of urine were found to decrease suggesting impaired osmoregulating function of the kidneys. The dysfunction revealed can be considered as an evidence of nephrotoxicity of G at a single injection. The dysfunctions revealed might be a result of impaired renal processes - glomerular filtration and tubular reabsorption. **CONCLUSION.** G injected in dose of 10 mg and 20 mg/100 g of body mass possesses a nephrotoxic action in rats within the first 2 hours after injection, that manifested itself as proteinuria, less diuresis and reduced glomerular filtration rate. Increased dose of G up to 20 mg/100 g of body mass resulted in increased proteinuria, that allows the nephrotoxic effect to be considered as dosedependent. Simultaneously a disturbance of the osmoregulating function of the kidneys is observed with their decreased ability to maximal dilution of urine.

Key words: kidneys, gentamicin, diuresis, proteinuria, glomerular filtration, tubular reabsorption, osmoregulating function.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что аминогликозиды (АГ), в частности гентамицин (Г), являются высокоактивным классом бактерицидных антибиотиков из числа ингибиторов синтеза белка в бактериальной клетке и сохраняют свое значение в лечении вне- и госпитальных инфекций. Все АГ являются потенциально нефротоксичными [1–3], что связано с наличием в их молекулах свободных аминогрупп в боковых цепях [4,5], и чаще, чем цефалоспорины или препараты пенициллиновой группы, вызывают развитие канальцевых дисфункций и некроз клеток канальцевого эпителия почек при относительной сохранности функции клубочкового аппарата [6]. Так, согласно данным ряда авторов, нефротоксические реакции при использовании Г отмечаются у 15–20 % всех госпитализированных больных [7,8], включая однократное его введение [9]. Поражение почек наблюдается при введении Г подопытным животным (белым крысам) в суточной дозе, соответствующей терапевтической. Данные изменения выявлены при длительном введении Г экспериментальным животным в течение 5–21 дней [3,6,10]. При этом до настоящего момента не изучено время появления первых признаков гентамицинобусловленной нефропатии, недостаточно исследована динамика и механизм развития ренальных дисфункций, вызванных введением Г, не установлен дозозависимый характер данных поражений при однократном введении препарата. Между тем, это необходимо учитывать при проведении антибиотикотерапии АГ, особенно у категории больных с почечной патологией и у детей первого года жизни, с целью разработки оптимального времени начала проведения и методов коррекции нефротоксических эффектов Г.

Учитывая вышеизложенное, целью нашего исследования стало изучение функционального состояния почек после однократного введения гентамицина, определение времени появления и механизма развития его нефротоксических эффектов, исследование динамики их развития и определение дозозависимости токсических эффектов гентамицина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Влияние Г на функцию почек изучено на 28 белых нелинейных крысах-самцах

массой 160–180 г в условиях индуцированного водного диуреза через 2 часа после однократного внутривентрикулярного введения из расчета 10 мг/100 г массы тела (серия 1, n=14), что соответствует терапевтической дозе препарата, и 20 мг/100 г массы тела (серия 2, n=14); контрольной группе животных (n=10) вводили дистиллированную воду. Функцию почек изучали после введения крысам в желудок водопроводной воды в количестве 5% от массы тела с помощью металлического зонда с дальнейшим сбором мочи в течение 2 ч. После получения мочи проводили забор крови и эвтаназию животных путем декапитации под эфирным наркозом. Определяли количество полученной мочи, содержание в ней белка. Концентрацию креатинина в моче (Ucr) и плазме крови (Pcr) определяли по реакции с пикриновой кислотой на спектрофотометре СФ-46, осмоляльность мочи (Uosm) и плазмы (Posm) – на осмометре 3ДЗ (США). Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) определяли по клиренсу эндогенного креатинина, рассчитывали экскрецию белка и осмотически активных веществ (ОАВ) в абсолютных величинах или относительно экскреции креатинина и на 1 мл СКФ, интенсивность реабсорбции и экскретируемую фракцию ОАВ, клиренс и фракцию осмотически свободной воды (ОСВ) [11]. Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерной программы «Excel 7.0». В таблицах степень достоверности указана только для статистически значимой разницы полученных показателей (p – не больше 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что введение крысам Г в дозе как 10 мг, так и 20 мг/100 г массы тела приводит уже в первые 2 часа к изменению целого ряда показателей деятельности почек. Так, данные, приведенные в табл. 1, указывают на достоверное уменьшение диуреза, как в абсолютных величинах, так и в относительных. Причем, после введения 20 мг Г наблюдается наиболее значительное

Таблица 1

Показатели функции почек у крыс через 2 ч после однократного введения гентамицина в дозе 10 и 20 мг/100 г массы тела в условиях индуцированного водного диуреза, $\bar{X} \pm m$

Показатели	Контроль, n=10	Серия 1, n=14	Серия 2, n=14
Диурез, мл/2ч	6,12±0,16	2,97±0,56 p<0,001	3,14±1,09 p¹<0,001
Диурез, мл/1ч/100гр	1,78±0,02	1,19±0,20 p<0,01	0,85±0,09 p¹<0,001
Диурез, %	71,31±0,88	47,72±8,04 p<0,01	34,44±3,30 p¹<0,001
Концентрация белка, мг/мл	22,00±0,58	103,8±17,4 p<0,001	382,44±98,80 p¹<0,01
Экскреция белка, мг/ч	0,04±0,01	0,17±0,04 p<0,001	0,31±0,05 p¹<0,001
Креатинин мочи, мкмоль/л	1155,80±47,10	1784,22±255,51	2846,00±136,68 p¹<0,001
Экскреция креатинина, мкмоль/ч	2,06±0,08	1,76±0,12	2,35±0,14

Примечание. p, p¹ < 0,05 относительно контроля, n – число наблюдений.

Таблица 2

Состояние основных почечных процессов (клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции) у крыс через 2 ч после однократного введения гентамицина в дозе 10 и 20 мг/100 г массы тела в условиях индуцированного водного диуреза, $\bar{X} \pm m$

Показатели	Контроль, n=10	Серия 1, n=14	Серия 2, n=14
Клиренс креатинина, мкл/ч/100г	29,07±0,49	23,35±2,05	24,77±1,86
Клиренс креатинина, мкл/мин/100г	504,05±15,09	389,23±34,11 p<0,001	412,67±30,98 p<0,02
Креатинин плазмы, мкмоль/л	67,70±0,93	74,00±3,20	85,84±4,68 p<0,01
Экскреция белка/экскреция креатинина, ед	0,02±0,006	0,09±0,002 p<0,01	0,14±0,02 p<0,001
Экскреция белка/СКФ мкмоль/1 мл СКФ	(1,31±0,56)10 ⁻³	(7,11±1,58)10 ⁻³ p<0,01	(7,51±1,58)10 ⁻³ p<0,01
Реабсорбция H ₂ O, %	94,05±0,20	94,34±1,48	96,56±0,12 p<0,001
Экскретируемая фракция H ₂ O, %	5,95±0,20	5,69±1,51	3,44±0,12 p<0,01

Примечание. p, p¹ < 0,05 относительно контроля, n – число наблюдений, СКФ – скорость клубочковой фильтрации.

Таблица 3

Показатели осморегулирующей функции почек у крыс через 2 ч после однократного введения гентамицина в дозе 20 и 10 мг/100 г массы тела в условиях индуцированного водного диуреза, $\bar{X} \pm m$

Показатели	Контроль, n=10	Серия 1, n=14	Серия 2, n=14
U _{osm} , мосмоль/л	103,3±1,68	142,43±15,32 p<0,02	195,38±9,85 p<0,001
P _{osm} , мосмоль/л	298,900,43	287,83±1,54 p<0,01	290,00±0,67 p<0,01
Экскреция ОАВ, мосмоль/ч	0,18±0,003	0,12±0,03	0,17±0,01
Фильтрационная фракция, мосмоль/мин/л	9,03±0,27	7,48±0,58	7,46±0,54 p<0,02
Общее количество реабсорбируемых ОАВ, мосмоль/ч	8,86±0,28	7,18±0,58 p<0,01	7,29±0,53 p<0,02
U _{osm} /P _{osm}	0,35±0,01	0,54±0,06 p<0,02	0,67±0,04 p<0,001
U _{cr} /P _{cr}	16,99±0,63	23,65±3,86	29,67±1,29 p<0,001
(U _{cu} /P _{cr}) / (U _{osm} /P _{osm})	49,42±2,31	37,08±3,35 p<0,01	45,64±3,19
Клиренс ОСВ, мл/ч	1,16±0,01	0,89±0,16	0,25±0,08 p<0,001
Фракция ОСВ при водном диурезе, %	66,26±0,59	64,07±10,33	37,93±6,00 p<0,001
Экскреция ОАВ /Экскреция креатинина, ед	0,09±0,003	0,07±0,002 p<0,001	0,07±0,003 p<0,001
Экскреция ОАВ /СКФ, мкмоль/ 1 мл СКФ	(6,59±1,34)10 ⁻³	(5,02±1,37)10 ⁻³	(6,13±0,62)10 ⁻³

Примечание. p, p¹ < 0,05 относительно контроля, n – число наблюдений, СКФ – скорость клубочковой фильтрации, U_{osm} – осмоляльность мочи. P_{osm} – осмоляльность плазмы, U_{cu} – креатинин мочи, P_{cr} – креатинин плазмы крови, ОАВ – осмотически активные вещества, ОСВ – осмотически свободная вода.

снижение мочеотделения, хотя оно недостоверно в сравнении с реакцией на 10 мг Г. Столь же четко регистрируется и резкое увеличение экскреции белка, причем нарастающее пропорционально дозе введенного препарата. Аналогичной была динамика изменений концентрации креатинина, которая увеличивалась в 1,5 раза после введения Г в дозе 10 мг и в 2,5 раза после 20 мг. Однако выделение креатинина даже снижалось после введения 10 мг препарата. Выявленные изменения показателей экскреторной деятельности позволяют расценивать их как доказательства нефротоксичности Г. Причем последние могут быть результатом нарушения почечных процессов – клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции.

Подтверждением данного суждения послужили данные, приведенные в табл. 2. Во-первых, достаточно четко зарегистрировано снижение СКФ по клиренсу эндогенного креатинина, что закономерно привело к умеренному, но достоверному увеличению креатинина в плазме крови. Во-вторых, при расчете протеинурии на единицу экскреции креатинина и 1 мл СКФ установлено увеличение показателей удельной протеинурии, указывающей на то, что потери белка каждым действующим не-

фроном возрастают еще более значимо. Это, в свою очередь, может быть доказательством повреждения под влиянием Г проксимальных канальцев, где и происходит реабсорбция профильтровавшегося белка. Косвенным подтверждением данного предположения может быть и то, что реабсорбция воды практически не изменялась после введения Г в дозе 10 мг и даже возростала после введения 20 мг препарата, что обуславливает изменение выведения воды из организма крыс. Это указывает, с одной стороны, на значимое изменение транспорта воды, скорее всего на уровне противоточно-умножительной системы почек, которое, однако, не носит характера угнетения транспорта. В то же время мы можем с уверенностью утверждать, что зарегистрированное нами уменьшение водного диуреза обусловлено как снижением клубочковой фильтрации (особенно после введения 10 мг Г), так и увеличением реабсорбции (при повышении дозы Г до 20 мг).

При этом приведенные данные указывают на возможные нарушения осморегулирующей функции почек, что полностью подтверждено нами при дальнейших исследованиях – табл. 3. Во-первых, мы обнаружили дозозависимый характер наруше-

ния осмотического разведения мочи. В то же время экскреция ОАВ изменялась недостоверно в связи с одновременным нарушением диуреза. Следовательно, под влиянием Г преимущественно нарушается выведение воды из организма крыс, что подтверждается данными клиренса ОСВ и ее фракции и, в свою очередь, является следствием увеличения реабсорбции воды в канальцах. В целом, можно говорить о функциональной недостаточности осморегулирующей функции почек. Подтверждением правомочности этого является снижение у подопытных животных осмоляльности плазмы крови, по-видимому, вследствие задержки воды в организме. В то же время почки достаточно эффективно выводят из организма конечные продукты обмена веществ (часть ОАВ). Их нормальное выведение происходит на фоне снижения фильтрационной фракции, что закономерно сопровождается уменьшением общего количества реабсорбированных ОАВ; однако одновременно снижается, хотя и недостоверно, интенсивность их канальцевой реабсорбции. В целом же уменьшается и выведение ОАВ на единицу экскретируемого креатинина и 1 мл СКФ. В итоге клиренс ОАВ также несколько снижается, но не достоверно. Следовательно, уменьшение фильтрации ОАВ частично компенсируется снижением их канальцевой реабсорбции. Таким образом, основным изменением осморегулирующей функции при водном диурезе у крыс после введения Г является увеличение реабсорбции воды и, скорее всего, это происходит на уровне петли Генле или в дистальных извитых канальцах. О последнем свидетельствует увеличение индекса осмотического концентрирования мочи почти вдвое. Если исходить из того, что значимого изменения реабсорбции ОАВ мы не установили, то повышение U_{osm}/P_{osm} может быть результатом только реабсорбции воды в дистальных канальцах, либо собирательных трубках. Это также подтверждается показателем концентрационного индекса креатинина (U_{cr}/P_{cr}), который характеризует совокупное концентрирование первичной мочи в нефроне. Увеличение данного показателя в среднем на 50% у крыс 1-й серии, а затем почти на 80% у крыс 2-й серии свидетельствует о справедливости нашего утверждения. Однако следует более подробно рассмотреть причины увеличения индекса U_{cr}/P_{cr} , так как частично он зависит от реабсорбции воды в проксимальном отделе нефрона. Но, на наш взгляд, повышение реабсорбции в проксимальном отделе не может иметь место; вероятнее всего, наличие протеинурии позволяет допустить иную ситуацию – снижение проксимальной реабсорбции. Однако

даже если это утверждение по меньшей мере не документировано, то повышение реабсорбции воды в проксимальном отделе нефрона на 50% и более вообще практически невозможно. В дополнение к вышеизложенному, мы рассчитали предложенный нами показатель соотношения концентрационного индекса креатинина к аналогичному индексу ОАВ, который, на наш взгляд, в какой-то мере «вычленяет» концентрирование на уровне проксимального канальца из общего концентрирования. Данные, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о снижении этого показателя после введения Г, и подтверждают наше предположение о возможном уменьшении реабсорбции воды в проксимальном отделе нефрона.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, введение крысам Г в дозе 100 мг/кг массы тела, что, с учетом более высокой чувствительности крыс/ кг массы тела (в 7 раз), позволяет сопоставлять используемые количества с минимально рекомендуемыми количествами препарата (разовой дозы – 0,4 мг/кг массы тела) и приводит к ряду нарушений почечной функции, что позволяет прийти к заключению о их нефротоксичности. Причем поражение нефрона происходит в первые 2 часа и реализуется как на клубочковом, так и на канальцевом уровне. Нефротоксичность Г носит дозозависимый характер, однако это относится исключительно к протеинурии. Последнее позволяет высказать предположение, что секреция Г в проксимальных канальцах создает условия для накопления в них препарата с последующим повреждением эпителия этого отдела нефрона. Снижение клубочковой фильтрации в этих условиях может происходить по механизму канальцево-клубочкового баланса, хотя нельзя исключить прямое повреждающее действие Г на клубочки почек. Следствием нефротоксического действия Г является нарушение способности почек к осмотическому разведению мочи и, в целом, выведению воды. Патогенез этого явления может быть обусловлен действием Г на эпителий дистальных отделов нефрона и их повреждением с увеличением проницаемости для воды. Однако не исключено, что Г преимущественно повреждает суперфициальные нефроны, что в свою очередь приводит к переключению почечного кровотока на юкстамедуллярные нефроны, которые работают преимущественно в режиме концентрирования и реабсорбции воды. Как следствие, снижается способность почек к максимальному осмотическому разведению мочи, а в организме задерживается часть введенной воды, что приводит к снижению осмоляльности плазмы

крови. Последнее является «физиологической ценной» адаптивной реакцией переключения с поверхностных на глубокие нефроны.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Г, введенный в дозах 10 мг и 20 мг/100 г массы тела, обладает нефротоксическим действием у крыс уже в первые два часа.

2. Нефротоксическое действие Г проявляется протеинурией, уменьшением диуреза и снижением клубочковой фильтрации.

3. С увеличением дозы Г до 20 мг/100 г массы тела возрастает протеинурия, что позволяет нефротоксический эффект препарата считать дозозависимым.

4. Однократное введение Г вызывает нарушение осморегулирующей функции почек с уменьшением способности к максимальному осмотическому разведению мочи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Рафальский ВВ. Лекарственные реакции антими-

робных препаратов, применяемых для лечения инфекций мочевыводящих путей (обзор). *Урология* 2000; (6): 51-55

2. Begg EJ, Barclay ML. Aminoglycosides: 50 years on. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 39: 597-603

3. Hosaka EM, Santos OFP, Seguro AC, Vattimo MFF. Effect of cyclooxygenase inhibitors on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(7): 979-985

4. Берязняков ИГ. Клинико-фармакологическая характеристика аминогликозидов (лекция). *Клин антибиотикотер* 2002; 5(19): 18-24

5. Катцунг БГ. *Базисная и клиническая фармакология*: в 2-х т. Том 2. Пер. с англ. М., СПб: Бином-Невский диалект; 1998; 670

6. Потапова АВ, Дзгоева ФУ, Кутырина ИМ и др. Тубулоинтерстициальные нарушения при нефротоксическом действии антибиотиков. *Урол и нефрол* 1995; 3:11-14

7. Appel GB. Aminoglycoside nephrotoxic. *Am J Med* 1990; 88 (3):16-20

8. Вікторов ОП, Коваленко ВУ, Логінов ІО, Яйченя ВП. Побічна дія антибіотиків аміноглікозидів: гентаміцин. *Совр проб токсикол* 2002; 3:72-76

9. Wetzels JF, Burke TJ, Schrier RW. Prevention and attenuation renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1992; 1(1): 133-140

10. Martinez-Salgado C, Nelida E, Ana IM et al. Gentamicin treatment induces simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats. *Kidney Int* 2004; 65: 2161-2171

11. Наточин ЮВ. *Основы физиологии почки*. Медицина, М, 1982; 212

Поступила в редакцию 22.04.2005 г.