

ФАРМАКОЛОГИЯ ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ЗНАЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПОЧЕК В ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ КРОЛИКОВ С ГИДРОНЕФРОЗОМ К НЕФРОТОКСИЧНОСТИ ГЕНТАМИЦИНА¹

К. М. Бушма²

Установлена связь между индивидуальными особенностями дыхания митохондрий коркового слоя почек кроликов с гидронефрозом и выраженностью нефротоксичности гентамицина. Поражение почек антибиотиком в большой степени проявляется у кроликов с исходно (до введения гентамицина) сниженной способностью митохондрий органа окислять α -кетоглутарат и, в меньшей степени, пальмитоилкарнитин и сукцинат.

Ключевые слова: кролики с гидронефрозом, дыхание митохондрий почек, гентамицин, предрасположенность к нефротоксичности

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо известна различная индивидуальная чувствительность почек животных и человека к поражению аминокликозидами [11, 12]. К нефротоксичности гентамицина предрасполагают следующие особенности интактных (без гидронефроза) почек: малый диаметр канальцев и клеток, выстилающих их просвет [2]; низкая интенсивность дыхания митохондрий [3], повышенное содержание продуктов перекисного окисления липидов в сочетании со сниженным антиоксидантным потенциалом [4].

Целью настоящего исследования явилось выяснение связи между особенностями дыхания митохондрий гидронефротической почки и предрасположенностью органа к нефротоксичности гентамицина.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на 13 кроликах-самках с исходной массой 2 – 3 кг. Под общей анестезией диэтиловым эфиром в стерильных условиях моделировали гидронефроз правой почки путем наложения шелковой лигатуры в верхней трети правого мочеточника (ограничение просвета приблизительно на 50 %). Степень развития гидронефроза контролировали с помощью УЗИ и, в последующем, после нефрэктомии.

Через 30 дней удаляли правую гидронефротическую почку и моделировали гидронефроз оставшейся левой почки как описано выше. В удаленной почке

изучали дыхательную и фосфорилирующую активность митохондрий [5] с использованием в качестве субстратов пальмитоилкарнитина (ПК), α -кетоглутарата (КГ) и сукцината (сукц.). При этом оценивали: V_1 — скорость дыхания при окислении эндогенных субстратов, V_2 — то же при окислении исследуемого субстрата, V_3 — дыхание в активном метаболическом состоянии при фосфорилировании АДФ до АТФ, V_4 — дыхание в состоянии покоя, ДК — коэффициент дыхательного контроля (показатель сопряжения дыхания и фосфорилирования по Чансу), КУ — коэффициент усиления по Ларди (показатель сродства дыхательной цепи к АДФ), АДФ/0 — показатель эффективности фосфорилирования, V_{ϕ} — скорость фосфорилирования экзогенного АДФ, $V_{\text{днф}}$ — скорость свободного дыхания митохондрий в условиях разобщения 2,4-динитрофенолом. На основании полученных результатов составляли “биохимический паспорт” гидронефротической правой почки каждого кролика.

Через 12 дней после правосторонней нефрэктомии и начала развития гидронефроза оставшейся левой почки моделировали ее токсическое поражение гентамицином (производитель — РУП “Борисовский завод медицинских препаратов”, Республика Беларусь) в мышцу (60 мг/кг/день, 5 дней) [8, 9].

Через 24 ч после последнего введения гентамицина из краевой вены уха брали кровь для проведения исследований. Затем кроликов умерщвляли путем введения 100 мг/кг гексенала (в краевую вену уха, болюсно, однократно). После остановки дыхания и сердца извлекали левую почку и брали мочу из мочевого пузыря (шприцем в стерильных условиях).

Степень выраженности нефротоксичности гентамицина по отношению к единственной левой гидронефротической почке оценивали с использованием морфологических (почка — окраска гематоксилином и эози-

¹ Исследование выполнено благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований при СМ РБ (грант Б98-022).

² Кафедра анестезиологии и реанимации с курсом клинической биохимии (зав. — проф. В. В. Спас) учреждения образования “Гродненский государственный медицинский университет”, Республика Беларусь, Гродно, 230015, ул. М. Горького, 80. E-mail: pharma@grsmu.by.

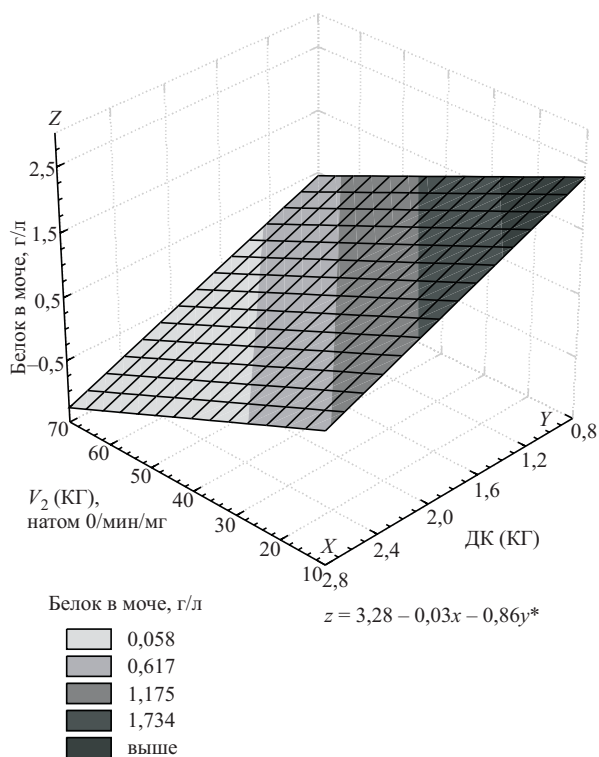


Рис. 1. Связь между содержанием белка в моче кроликов с единственной левой гидронефротической почкой (Z; после интоксикации гентамицином), значениями дыхания митохондрий коркового слоя гидронефротической правой почки (до интоксикации гентамицином) при использовании в качестве субстрата окисления КГ: V_2 (X) и ДК (Y).

Степень альбуминурии отражает интенсивность цвета и цифровые значения, представленные на шкале справа. Уравнение регрессии приведено под рисунком, * — $p < 0,05$.

ном), биохимических и клинических (моча, кровь) исследований.

В гистологических срезах почки, окрашенных гематоксилином и эозином, определяли процент некротизированных корковых (КН) и юкстамедулярных нефронов (ЮН). В моче регистрировали содержание белка. В крови изучали содержание мочевины реакцией с реактивами фирмы “Abbott” (США), креатинина (Яффе-кинетическим методом с реактивами фирмы “Hospitex Diagnosties”), уровень средних молекул [6].

Для нахождения взаимосвязей между особенностями дыхания митохондрий гидронефротической правой почки и характером, степенью выраженности нефротоксичности гентамицина по отношению к единственной гидронефротической левой почке использовали методы корреляционного, пошагового многофакторного регрессионного, дисперсионного (ANOVA) и канонического анализа [1, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что ограничение просвета мочеточника приблизительно на 50 % путем наложения шелковой лигатуры в его верхней трети сопровождается раз-

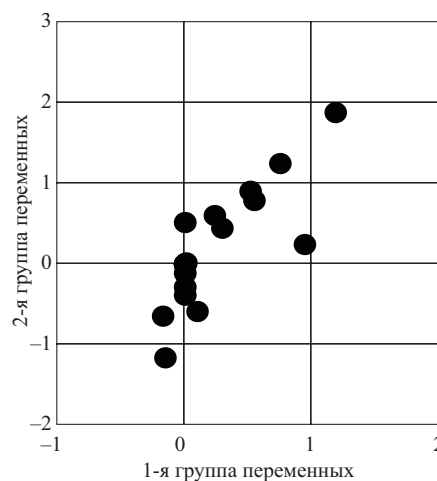


Рис. 2. Множество исследуемых животных в координатах 1-й и 2-й групп переменных.

1-я переменная — показатель нефротоксичности гентамицина по отношению к единственной левой гидронефротической почке. 2-я группа переменных — показатели дыхания митохондрий гидронефротической правой почки до интоксикации гентамицином. Кружки — отдельные кролики.

витием выраженного гидронефроза. Это подтверждается УЗИ (ослабление дыхательной подвижности почки, снижение толщины паренхимы, расширение лоханки в 2 – 3 раза, отсутствие контуров мочеточника в верхней трети) и после нефрэктомии (застой мочи выше лигатуры с резким расширением верхней трети мочеточника и почки). Установлена вариабельность дыхания митохондрий гидронефротической левой почки в популяции кроликов (табл. 1).

Гентамицин в указанной дозе и кратности введения кроликам с единственной гидронефротической левой почкой оказал нефротическое действие, степень выраженности которого в популяции животных сильно варьирует (табл. 1).

Корреляционный анализ. Взаимосвязей между особенностями дыхания митохондрий правой гидронефротической почки кроликов (до интоксикации гентамицином) и количеством некротизированных КН, ЮН в оставшейся левой гидронефротической почке, а также содержанием мочевины и креатинина в крови (после интоксикации гентамицином) не установлено (табл. 1).

Доказано, что содержание белка в моче кроликов с единственной гидронефротической левой почкой после интоксикации гентамицином максимально у животных с исходно сниженной способностью митохондрий окислять α -КГ: низкие значения V_1 , V_2 , V_3 , ДК, V_ϕ . Повышенное содержание в крови этих кроликов средних молекул ассоциируется с исходно низкой способностью митохондрий почки окислять ПК (низкие значения V_1 , V_2 , V_ϕ) и сукцинат (низкие значения КУ), табл. 1.

Пошаговый многофакторный регрессионный анализ. Взаимосвязь между показателями нефротоксично-

сти гентамицина по отношению к единственной гидронефротической левой почке и особенностями дыхания митохондрий правой гидронефротической почки (до интоксикации гентамицином) представлена в табл. 2 в форме уравнений множественной линейной регрессии.

Установлено, что вызванная гентамицином альбуминурия у кроликов с единственной левой гидронефротической почкой максимальна у животных с исходно сниженной (до воздействия антибиотиком) способностью митохондрий гидронефротической правой почки окислять КГ. Это проявилось при анализе содержания белка в моче со следующими показателями окисления КГ митохондриями почек: V_1 (с одной стороны) и $V_2, V_3, ДК, V_{\phi}$ (с другой), а также V_2 с $V_3, ДК, V_{\phi}$; V_3 с $ДК$ и V_{ϕ} ; $ДК$ с V_{ϕ} . Взаимосвязь показателей описывается уравнениями 1 – 10 линейной регрессии (табл. 2).

Уровень средних молекул в крови этих животных максимален у кроликов со сниженной способностью митохондрий почки окислять ПК и сукцинат. Это выявлено при анализе содержания средних молекул в крови со следующими показателями дыхания митохондрий почки: $V_1(ПК)$ (с одной стороны) и $V_2(ПК), V_{\phi}(ПК), КУ$ (сукц.); $V_2(ПК)$ с $V_{\phi}(ПК), КУ$ (сукц.); $V_{\phi}(ПК)$ с $КУ$ (сукц.). Взаимосвязь показателей описывается уравнениями 11 – 16 линейной регрессии (табл. 2).

В качестве примера на рис. 1 представлено графическое изображение уравнения линейной регрессии № 6 (см. табл. 2). Как видно из данных рис. 1, по мере снижения дыхания митохондрий коркового слоя гидронефротической правой почки кроликов при использовании в качестве субстрата окисления КГ (снижение значений V_2 и ДК), в моче этих животных (с единственной левой гидронефротической почкой после интоксикации гентамицином) нарастает альбуминурия.

Дисперсионный анализ. Установлена статистическая значимость уравнений 1 – 16 (см. табл. 2), $p < 0,05$.

Канонический анализ. Между группами переменных, характеризующих дыхание митохондрий гидронефротической правой почки кроликов (до интоксикации гентамицином), и показателями нефротоксичности антибиотика по отношению к единственной левой гидронефротической почке существует сильная прямая каноническая корреляционная связь. Коэффициент канонической корреляции $R = 0,89$. Это видно по вытянутому вдоль прямой расположению облака точек в координатах нормированных значений первых канонических переменных для двух групп наблюдений (показатели до и после интоксикации) (рис. 2). Для интерпретации использована статистически значимая (значение критерия $\chi^2 = 39,55$ и соответствующее значение $p = 0,002$) первая каноническая переменная. Эта переменная — показатель нефротоксичности — определена содержанием белка в моче (коэффициент кор-

Таблица 1. Коэффициенты корреляции между показателями в правой гидронефротической почке кроликов (до интоксикации гентамицином) и показателями нефротоксического действия антибиотика по отношению к единственной левой гидронефротической почке

Показатель дыхания митохондрий гидронефротической правой почки до интоксикации гентамицином	Показатели нефротоксичности гентамицина у кроликов с единственной гидронефротической левой почкой					
	% некротизированных			Кровь, ммоль/л		
	КН (5,0 – 31,3)	ЮН (6,3 – 58,3)	Белок в моче (0,04 – 3,60 г/л)	мочевина (4,5 – 16,2)	креатинин (0,02 – 0,31)	средние молекулы (0,23 – 0,43)
<i>Окисление пальмитоилкарнитина</i>						
V_1 (5 – 27 натом О/мин/мг)	+ 0,22	+ 0,02	– 0,01	– 0,23	– 0,55	– 0,58
V_2 (7 – 31 натом О/мин/мг)	+ 0,23	– 0,11	– 0,18	– 0,29	– 0,53	– 0,58
V_{ϕ} (23 – 188 нмоль АДФ/мин/мг)	+ 0,19	– 0,16	+ 0,28	– 0,41	– 0,35	– 0,76
<i>Окисление α-кетоглутарата</i>						
V_1 (7 – 37 натом О/мин/мг)	+ 0,13	– 0,03	– 0,64	– 0,07	– 0,35	– 0,47
V_2 (14 – 60 натом О/мин/мг)	+ 0,12	– 0,03	– 0,64	+ 0,07	– 0,13	– 0,27
V_3 (37 – 124 натом О/мин/мг)	+ 0,09	– 0,11	– 0,63	+ 0,05	– 0,37	– 0,51
ДК (1,10 – 2,64)	+ 0,22	+ 0,28	– 0,63	+ 0,55	– 0,06	– 0,23
V_{ϕ} (71 – 320 нмоль АДФ/мин/мг)	+ 0,09	– 0,06	– 0,65	+ 0,11	– 0,26	– 0,50
<i>Окисление сукцината</i>						
КУ (1,63 – 8,70)	– 0,01	– 0,26	+ 0,16	– 0,31	– 0,47	– 0,69

Примечание. Приведены показатели дыхания митохондрий, для которых установлена взаимосвязь с показателями нефротоксичности гентамицина. В скобках — вариабельность показателей в популяции кроликов от минимального до максимального значений. Здесь и в табл. 2. выделены достоверные взаимосвязи ($p < 0,05$) линейного типа.

Таблица 2. Уравнения линейной регрессии, описывающие взаимосвязи между показателями нефротоксичности гентамицина по отношению к единственной левой гидронефротической почке и особенностями дыхания митохондрий гидронефротической правой почки до интоксикации антибиотиком

№ уравнения	Показатели нефротоксичности гентамицина (Z)	Показатели до интоксикации гентамицином		Уравнение линейной регрессии	Коэффициенты корреляции		
		(X)	(Y)				
1	Белок в моче	V_1 (КГ)	V_2 (КГ)	$z = 2,19 - 0,05y$	$R^2 = 41 \%, R = 0,64$		
2			V_3 (КГ)	$z = 2,14 - 0,08x$	$R^2 = 41 \%, R = 0,64$		
3			ДК(КГ)	$z = 3,12 - 1,35y$	$R^2 = 39 \%, R = 0,63$		
4		V_2 (КГ)	V_Φ (КГ)	$z = 2,23 - 0,01y$	$R^2 = 43 \%, R = 0,66$		
5			V_3 (КГ)	$z = 2,19 - 0,05x$	$R^2 = 41 \%, R = 0,64$		
6			ДК(КГ)	$z = 3,28 - 0,03x - 0,86y$	$R^2 = 53 \%, R = 0,73$		
7		V_3 (КГ)	V_Φ (КГ)	$z = 2,23 - 0,01y$	$R^2 = 43 \%, R = 0,66$		
8			ДК(КГ)	$z = 3,34 - 0,02x - 0,82y$	$R^2 = 50 \%, R = 0,69$		
9			V_Φ (КГ)	$z = 2,23 - 0,01y$	$R^2 = 43 \%, R = 0,66$		
10		Средние молекулы в крови	ДК(КГ)	V_Φ (КГ)	$z = 2,23 - 0,01y$	$R^2 = 43 \%, R = 0,66$	
11				V_1 (ПК)	V_2 (ПК)	$z = 0,39 - 0,01y$	$R^2 = 33 \%, R = 0,58$
12					V_Φ (ПК)	$z = 0,40 - 0,001y$	$R^2 = 57 \%, R = 0,76$
13			КУ (сукц.)		$z = 0,52 - 0,09y$	$R^2 = 48 \%, R = 0,69$	
14			V_2 (ПК)	V_Φ (ПК)	$z = 0,40 - 0,001y$	$R^2 = 57 \%, R = 0,76$	
15				КУ (сукц.)	$z = 0,52 - 0,09y$	$R^2 = 48 \%, R = 0,69$	
16		V_Φ (ПК)		КУ (сукц.)	$z = 0,40 - 0,001y$	$R^2 = 57 \%, R = 0,76$	

реляции $R = 0,95$). Наибольшее влияние на первую каноническую переменную среди показателей 2-й группы (показатели до интоксикации гентамицином) оказывают: V_1 , V_2 , ДК (КГ). Доказано, что в 81 % случаев к нефротоксичности гентамицина предрасположены кролики с гидронефрозом, имеющие низкие значения вышеуказанных показателей дыхания митохондрий с использованием в качестве субстрата окисления КГ. В 19 % случаев предрасположенность обусловлена влиянием других случайных неучтенных факторов (рис. 2).

Таким образом, с использованием методов математического моделирования (корреляционный, пошаговый многофакторный регрессионный, дисперсионный и канонический анализ) доказана тесная взаимосвязь между особенностями дыхания митохондрий коркового слоя правой гидронефротической почки кроликов (до интоксикации гентамицином) и степенью его нефротоксического действия по отношению к единственной левой гидронефротической почке. Особенно отчетливо это проявилось по отношению к V_1 (КГ), V_2 (КГ), ДК (КГ), V_Φ (ПК) (до введения гентамицина) и содержанием белка в моче (после).

Пытаясь объяснить данную взаимосвязь, мы исходили из того, что гентамицин секретируется в неизменном виде в мочу клетками проксимальных извитых канальцев. При этом высокие концентрации антибиотика ингибируют процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях [13]. Предполагается, что катион гентамицина конкурирует с ионами кальция [10] и магния [14] за центры связывания на мембране митохондрий. Это приводит к торможению энергетического обмена и вносит существенный вклад в патогенез нефротоксического действия аминогликозида.

Следовательно, кролики с исходно сниженной функциональной активностью митохондрий в большей степени подвержены развитию в последующем нефротоксического действия гентамицина. Как видно из данных табл. 1 и 2, наиболее отчетливо это проявилось при использовании в качестве субстрата КГ и в меньшей степени ПК и сукцината.

Ранее нами установлено, что к нефротоксичности гентамицина предрасположены интактные кролики со сниженной функциональной активностью митохондрий коркового слоя почки (преимущественно при использовании в качестве субстрата окисления ПК) [3]. Это положение продемонстрировано также и в настоящем исследовании у кроликов с гидронефрозом. Сравнительный анализ результатов исследования двух групп животных показал, что сниженная интенсивность дыхания митохондрий коркового слоя как интактной, так и гидронефротической почки (до введения гентамицина) примерно в одинаковой степени предрасполагает кроликов к нефротоксичности аминогликозида. Различия заключаются в том, что у интактных кроликов биомаркерами нефротоксичности являются преимущественно показатели окисления ПК, в то время как у животных с гидронефрозом — КГ.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены значительные индивидуальные различия способности митохондрий коркового слоя гидронефротической почки кроликов окислять пальмитоилкарнитин, α -кетоглутарат и сукцинат.

2. Степень нефротоксичности гентамицина по отношению к гидронефротической почке в популяции кроликов значительно варьирует.

3. К нефротоксичности гентамицина предрасположены кролики с исходно сниженной (до интоксикации антибиотиком) способностью митохондрий коркового слоя гидронефротической почки окислять α -кетоглутарат.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. Афифи, С. Эйзен, *Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ*, "Мир", Москва (1982).
2. К. М. Бушма, Л. С. Кизюкевич, М. И. Бушма и др., *Бюл. экпер. биол.*, **11**, 544 – 549 (2004).
3. К. М. Бушма, *Токсикол. вестн.*, **6**, 25 – 30 (2005).
4. К. М. Бушма, *Экспер. и клин. фармакол.*, **1**, 33 – 37 (2006).
5. Р. Н. Этингоф, Ю. В. Наточин, С. А. Шухолуков и др., *Вопр. мед. химии*, **12**(4), 387 – 393 (1966).
6. В. С. Камышников, *Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике*, Т. 1, Беларусь (2000).
7. В. Ю. Урбах, *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*, Медицина, Москва (1975).
8. K. A. Abu-Stephan and A. A. Abdel-Gayoum, *Arch. Toxicol.*, **75**(5), 284 – 290 (2001).
9. J. I. Sr. Enziguez, M. Schydlower, K. C. O'Hair, et al., *Vet. Hum. Toxicol.*, **34**(1), 32 – 35 (1992).
10. M. Sastras, J. M. Weinberg, and H. D. Humes, *Life Sci*, **30**, 2309 – 2315 (1982).
11. J. J. Schentag and M. E. Plaut, *Kidney Int.*, **17**(5), 654 – 661 (1980).
12. M. A. Sens, D. J. Hazen-Martin, and Sens D. A., *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **23**(5), 362 – 368 (1993).
13. C. F. Simmons, R. T. Bogusky, and H. D. Humes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **214**(3), 709 – 715 (1980).
14. J. M. Weinberg and H. D. Humes, *Arch. Biochem.*, **205**(1), 222 – 231 (1980).

Поступила 29.09.07

THE ROLE OF THE FUNCTIONAL STATE OF KIDNEY MITOCHONDRIA IN PREDISPOSITION OF HYDRONEPHROTIC RABBIT TO AMINOGLYCOSIDE (GENTAMICIN) NEPHROTOXICITY

K. M. Bushma

Grodno State Medical University, ul. Gor'kogo 80, Grodno, 230015, Belarus
E-mail: pharma@grsmu.by

A correlation between the individual features of renal mitochondrial respiration in hydronephrotic rabbits and the degree of manifestation of gentamicin nephrotoxicity is established. The damage of kidney by the antibiotic is manifested to a greater extent in rabbits with the initial (before the administration of gentamicin) reduced ability of mitochondria to oxidize alpha-ketoglutarate, and to a lesser extent in rabbits with the reduced ability of mitochondria to oxidize palmitoilkarnitin and succinate.