

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 615.739.6:616.61-08

ВОЗМОЖНОСТИ ГЛИЦИНА КАК ЦИТОПРОТЕКТОРА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕНТАМИЦИНОВОЙ НЕФРОПАТИИ

С.М. Напалкова, О.С. Селиванова

Ульяновский государственный университет

Изучены нефропротекторные свойства глицина в условиях экспериментального гентамицин-индуцированного повреждения почек. Установлено, что применение глицина позволило предупредить вызванную гентамицином почечную недостаточность, оказало положительное влияние на структурные изменения в почках крыс, предупредило развитие окислительного стресса и снижение активности антиоксидантных ферментов.

Ключевые слова: гентамицин, нефропатия, глицин, окислительный стресс.

Введение. Нефротоксичность антибактериальных препаратов часто протекает скрыто, поэтому редко привлекает внимание врача в достаточной степени [6; 11]. Широко применяемые для лечения тяжелых форм инфекционно-воспалительных заболеваний аминогликозидные антибиотики [1] считаются одной из основных причин развития лекарственного поражения почек [4; 6; 8]. Экспериментальная гентамициновая нефропатия является одной из распространенных в фармакологии моделей для нефротоксичности и изучения нефропротекторного действия лекарственных средств [8].

Механизм стимуляции гентамицином повреждения почек до конца еще не выяснен [15]. Большинство исследователей связывают его с образованием активных форм кислорода и ослаблением антиоксидантной защиты [14; 17; 20]. Кроме того, наибольшее снижение аминогликозидной токсичности наблюдалось при использовании веществ, предупреждающих или уменьшающих вызванное гентамицином развитие оксидативного стресса в почках животных [7;

13; 19].

Процессы перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты биологических мембран тесно связаны с другими метаболическими процессами [5], поэтому поиск веществ-метаболитов, способных индуцировать внутриклеточную антиоксидантную защиту, является перспективным подходом к снижению оксидативных повреждающих факторов [13]. Одним из таких веществ является аминокислота глицин [2; 9; 16].

В анализируемой нами литературе не было найдено данных о возможности применения глицина для коррекции нефротоксических эффектов аминогликозидных антибиотиков, что и послужило мотивацией для проведения настоящего исследования.

Цель работы. Экспериментальное изучение нефропротекторных свойств глицина на гентамициновой модели поражения почек.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 35 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах весом 240–290

г. Животные были разделены на пять равных групп (табл. 1).

Таблица 1

Схема проведения эксперимента

п/п	Условия эксперимента	Количество животных
1.	<i>Интakтные животные</i>	n=7
2.	<i>Контрольные животные</i> (0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида однократно внутривбрюшинно в течение 7 дней)	n=7
3.	<i>Гентамицин</i> (100 мг/кг/сутки однократно внутривбрюшинно в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида в течение 7 дней)	n=7
4.	<i>Глицин</i> (50 мг/кг/сутки однократно внутривбрюшинно в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида) за 30 минут до каждой инъекции гентамицина	n=7
5.	<i>Глицин</i> (50 мг/кг/сутки однократно внутривбрюшинно в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида в течение 7 дней)	n=7

Все манипуляции, причиняющие животным боль, проводились под общим наркозом (этамилал-натрий из расчета 50 мг/кг внутривбрюшинно). Животные умерщвлялись путем декапитации. При этом производился забор крови путем пункции сердца для исследования концентрации креатинина, мочевины и глутатионпероксидазы. Моча забиралась из мочевого пузыря для определения концентрации общего белка.

Немедленно после забора биологических жидкостей левая и правая почки удалялись и взвешивались. Левая почка использовалась для изучения показателей перекисного окисления липидов (концентрации малонового диальдегида, белковых карбонильных групп и восстановленного глутатиона) и состояния антиоксидантной системы (активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы), правая почка – для гистологического исследования с помощью световой микроскопии.

Известно, что гентамицин вызывает поражение преимущественно проксимальных канальцев, при этом структура клубочков практически не повреждается [10], именно по этой причине особое внимание при изучении почечных срезов уделялось тубулярной структуре. В каждом срезе под микроскопом

с помощью окулярной сетки в 25 полях зрения (при увеличении 15x10x1,6) оценивались и подсчитывались все нормальные канальцы и канальцы с гистопатологическими альтерациями (набухание, эндоплазматическая вакуолизация, десквамация и некроз). Затем рассчитывалось процентное отношение канальцев с гистопатологическими альтерациями к их общему количеству.

Почечные срезы животных дифференцировались по степеням выраженности канальцевых изменений с использованием следующих критериев:

степень 0 – нормальная гистологическая картина (отсутствие альтераций);

степень I – небольшие ограниченные участки канальцев с альтерациями (1–25 % от общего числа);

степень II – четко визуализируемые канальцы с гистопатологическими альтерациями, но занимающие менее половины от общего числа (26–50 %);

степень III – более половины канальцев с различными альтерациями, но еще можно идентифицировать интактные участки (51–75 %);

степень IV – все или почти все канальцы с альтерациями (76–100 %).

Результаты исследования были подвергнуты статистической обработке на

персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ Unistat Statistical Package 5.001. Оценку достоверности различий проводили по χ^2 и t-критерию Стьюдента. Статистически достоверными признавались различия между группами при 95 % уровне значимости.

Результаты и обсуждение. В группе контрольных животных, которым вводили изотонический раствор хлорида натрия, не наблюдалось достоверных изменений изучаемых показателей по сравнению с животными интактной группы.

Гентамицин вызвал повышение в сыворотке крови концентрации креатинина на 38 % (с $0,80 \pm 0,05$ до $1,10 \pm 0,07$ мг/100 мл, $p < 0,01$), мочевины на 72 % (с $18,98 \pm 0,56$ до $32,56 \pm 0,79$ мг/100 мл, $p < 0,001$) по сравнению с данными контрольной группы животных, что свидетельствовало о развитии острой почечной недостаточности у крыс. Профилакти-

ческое введение глицина за 30 минут до каждой инъекции аминогликозидного антибиотика предупредило эти изменения. Глицин (50 мг/кг), применяемый без гентамицина, не вызвал достоверных изменений изучаемых показателей по сравнению с группами интактных и контрольных животных (рис. 1 и 2).

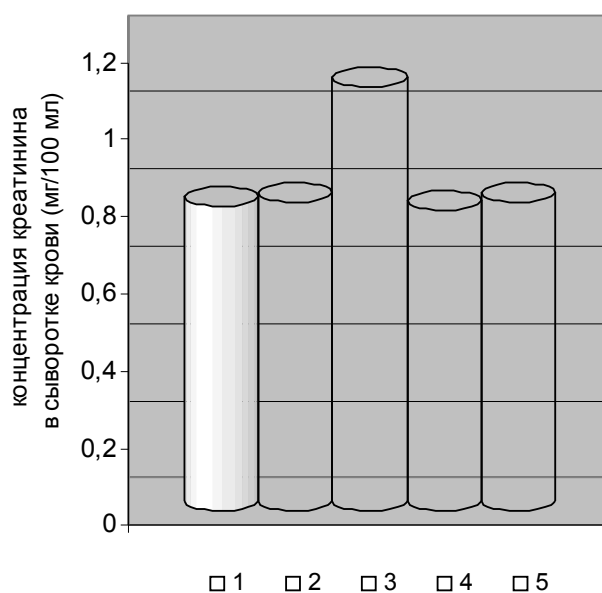


Рис. 1. Влияние исследуемых препаратов на концентрацию креатинина в сыворотке крови у крыс: 1 – интактные животные, 2 – контроль, 3 – гентамицин, 4 – глицин + гентамицин, 5 – глицин

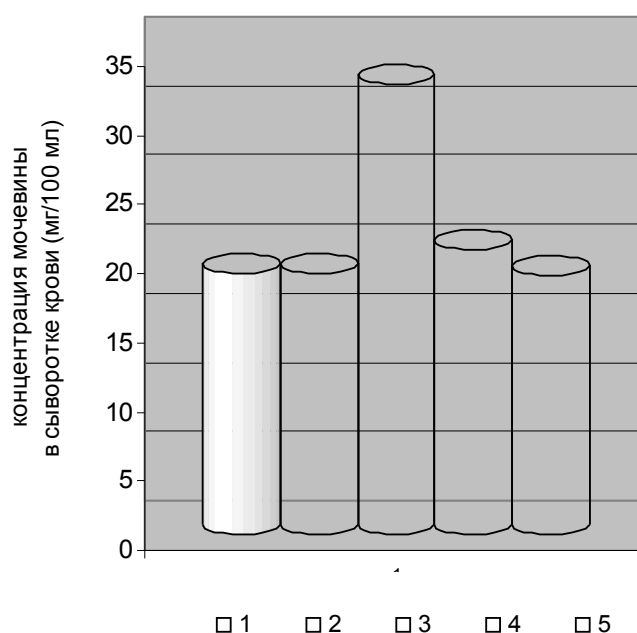


Рис. 2. Влияние исследуемых препаратов на концентрацию мочевины в сыворотке крови у крыс:
1 – интактные животные, 2 – контроль, 3 – гентамицин, 4 – глицин + гентамицин, 5 – глицин

У животных, получавших гентамицин, наблюдалась потеря в весе по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$) (табл. 2). Это объясняется тем, что при острой почечной недостаточности наблюдается увеличение катаболизма, приводящего к ацидозу, сопровождаемому анорексией [8], из-за

которого уменьшается количество принимаемой животными пищи. Глицин предупредил потерю животными в весе, что было связано, возможно, с предотвращением им развития острой почечной недостаточности.

Таблица 2

Изменение общего веса и веса почек животных под влиянием исследуемых препаратов

Группа	Изменение общего веса (г)	Вес почек/100 г общего веса (мг)
Интактные животные	28,63±4,08	0,87±0,03
Контроль	30,02±5,24	0,89±0,06
Гентамицин	-8,93±6,51 ^{△△○○}	1,08±0,05 ^{△○}
Глицин+гентамицин	24,31±5,62 ^{**}	1,04±0,06
Глицин	27,38±7,15	0,92±0,06

Примечания: статистически достоверно по сравнению с интактной группой [△] – при $p < 0,05$ и ^{△△} – при $p < 0,01$; с контрольной группой [○] – при $p < 0,05$ и ^{○○} – при $p < 0,01$; ^{**} – с группой животных, получавших только гентамицин ($p < 0,01$).

Введение гентамицина привело к повреждению 63 % проксимальных трубочек.

14 % животных данной группы имели II степень, а 86 % – III степень выраженности

тубулопатии. Известно, что проксимальные канальцы являются первичным очагом кумуляции значительной концентрации антибиотика в почках [12], это и обуславливает повреждение при гентамициновой нефропатии в основном тубулярной структуры [10]. Результаты гистологического анализа почечных срезов, полученные в ходе нашего эксперимента, согласовывались с этими данными.

Эпителий проксимальных канальцев является основной локализацией синтеза фермента глутатионпероксидазы [12]. У животных гентамициновой группы наблюдалось снижение на 47 % активности данного фермента в сыворотке крови по сравнению с контрольными животными (с $4,38 \pm 0,48$ до $2,32 \pm 0,27$ мкмоль/мин/мл, $p < 0,01$), что подтвердило наличие повреждения канальцевой структуры почек.

Тубулопатия обуславливает развитие отека интерстициальной ткани, поэтому у животных, получавших только гентамицин, наблюдалось увеличение соотношения веса почек к общему весу ((вес правой + вес левой почки)/вес крысы $\times 100$) ($p < 0,05$) (табл. 2).

Глицин уменьшил выраженность канальцевого повреждения, которое у животных данной группы составило 14 % от общего числа проксимальных трубочек. У 14 % крыс данной группы была I степень, у 57 % – II и у 29 % – III степень повреждения (рис. 3). При этом сохранилась активность фермента глутатионпероксидазы в сыворотке крови животных, получавших профилактически глицин ($4,02 \pm 0,53$ мкмоль/мин/мл), а соотношение веса почек к общему весу животных при введении глицина достоверно не отличалось от контрольных данных (табл. 2).

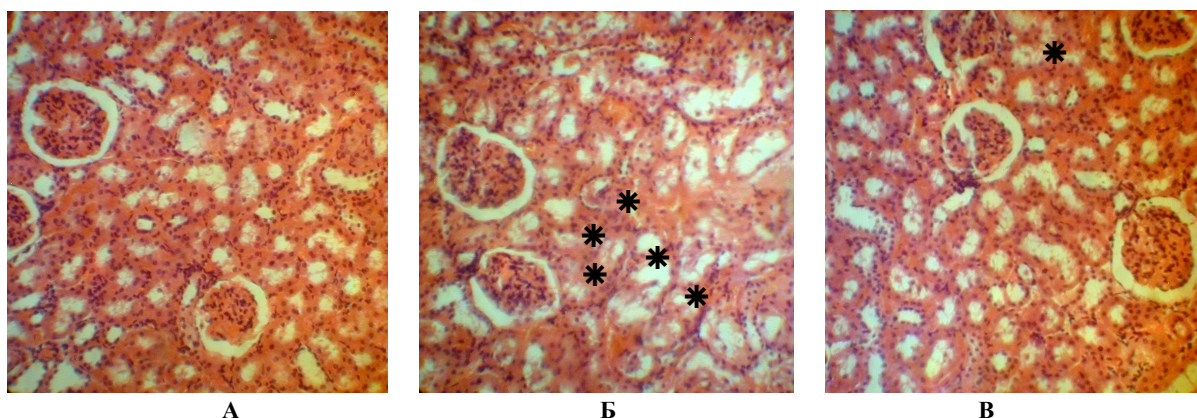


Рис. 3. Срезы коркового вещества почек животных следующих групп: А) контроль; Б) гентамицин; В) глицин+гентамицин (микрофото)

Примечание. * – проксимальные канальцы с аalterациями.

О степени свободно-радикального окисления в почках при гентамициновом повреждении мы судили по концентрации продуктов перекисления и активности антиоксидантных ферментов. Гентамицин вызвал повышение содержания белковых карбонильных групп на 42 % ($p < 0,01$), малонового диальдегида на 24 % ($p < 0,01$), снижение концентрации восстановленного глутатиона на 12,5 % ($p < 0,05$) по сравнению с

аналогичными данными контрольных животных. Введение глицина позволило предупредить гентамицин-индуцированное увеличение содержания малонового диальдегида и белковых карбонильных групп, а также понижение концентрации восстановленного глутатиона в гомогенате почек экспериментальных животных (табл. 3).

Таблица 3

Влияние исследуемых препаратов на содержание показателей оксидативного стресса и активность антиоксидантных ферментов в почках у крыс

Группа	Интактные	Контроль	Гентамицин	Глицин + гентамицин	Глицин
Белковые карбонильные группы (моль/мг белка)	2,02±0,12	1,92±0,12	2,73±0,14 ^{ΔΔ} ^{○○}	2,31±0,09 *	1,97±0,15
Малоновый диальдегид (нмоль/мг белка)	1,92±0,07	1,90±0,09	2,36±0,09 ^{ΔΔ} ^{○○}	2,06±0,04 *	1,93±0,12
Восстановленный глутатион (мкг/мг белка)	2,73±0,05	2,73±0,07	2,39±0,07 [°]	2,68±0,09 *	2,72±0,09
Супероксиддис мутаза (мкмоль/мин/ мг белка)	1,85±0,09	1,86±0,08	1,54±0,06 [°]	1,80±0,06 *	1,84±0,06
Глутатионпероксидаза (мкмоль/ мин/мг белка)	1,96±0,08	1,97±0,07	0,80±0,07 ^{ΔΔΔ} ^{○○○}	1,88±0,11***	1,91±0,09
Глутатионредуктаза (нмоль/мин/мг белка)	5,39±0,13	5,37±0,13	2,96±0,24 ^{ΔΔΔ} ^{○○○}	5,08±0,16 ***	5,41±0,12

Примечания: статистически достоверно по сравнению с интактной группой ^{ΔΔ} – при $p < 0,01$ и ^{ΔΔΔ} – при $p < 0,001$; с контрольной группой [°] – при $p < 0,05$, ^{○○} – при $p < 0,01$ и ^{○○○} – при $p < 0,001$; с группой животных, получавших только гентамицин, * – при $p < 0,05$ и *** – при $p < 0,001$.

Развитию оксидативного стресса в почках крыс гентамициновой группы также способствовал тот факт, что активные формы кислорода, образование которых повысилось под действием аминогликозидного антибиотика, могут стимулировать инактивацию антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы в корковом веществе почек, что и наблюдалось в данном исследовании. Активность супероксиддисмутазы понизилась на 17 % ($p < 0,05$), глутатионпероксидазы – на 11 % ($p < 0,001$), а глутатионредуктазы – на 45 % ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными животными. Глицин сохранил активность всех трех изучаемых антиоксидантных ферментов, что значительно улучшило антиоксидантный статус животных (табл. 3).

Полученные результаты указывают, что развитие оксидативного стресса и уменьшение активности антиоксидантных ферментов можно считать одним из патогенетических звеньев гентамициновой нефротоксичности у крыс, одним из возможных механизмов нефропротекторного действия глицина является антиоксидантная активность аминокислоты, проявляющаяся в

способности сохранять активность антиоксидантных ферментов и предупреждать развитие оксидативного стресса в почках крыс.

Заключение. Таким образом, нами было установлено, что глицин обладает свойствами цитопротектора в условиях гентамицинового повреждения почек у крыс. Его применение предупреждает вызванную аминогликозидным антибиотиком почечную недостаточность, оказывает положительное влияние на структурные изменения в почках крыс, предотвращает развитие окислительного стресса и снижение активности антиоксидантных ферментов.

1. *Навашин, С.М.* Антибиотики группы аминогликозидов / С.М. Навашин, И.П. Фомина, Ю.О. Сазыкин. – М. : Медицина, 1977. – 103 с.

2. Ограничение гипероксидации липидов и предупреждение стрессорных повреждений сердца производными глицина / В.В. Малышев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1996. – Т. 56. – №5. – С. 23–25.

3. *Парфенов, В.А.* Метаболическая терапия ишемического инсульта / В.А. Парфенов // Русский медицинский журнал. – 2002. – Т. 10. – №25. – С. 27–34.

4. *Тареева, И.Е.* Лекарственные поражения почек / И.Е. Тареева, А.Ю. Николаев, С.О.

Андросова // Нефрология / под ред. И.Е. Тареевой. – М., 1995. – С. 299–312.

5. Шмелева, Л.Т. Антиоксидантные системы организма при экспериментальной и клинической патологии / Л.Т. Шмелева // Сборник научных трудов. – Свердловск, 1987. – 163 с.

6. Яковлева, О.А. Механизмы нефротоксичности антибиотиков / О.А. Яковлева, В.В. Царук // Украинский химиотерапевтический журнал. – 2000. – Т. 8. – №4. – С. 66–71.

7. Abdel-Naim, A.B. Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats / A.B. Abdel-Naim, M.H. Abdel-Wahab, F.F. Attia // Pharmacol. Res. – 1999. – №2. – P. 183–187.

8. Ali, B.H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research / B.H. Ali // Gen. Pharmacol. – 1995. – № 26. – P. 1477–1487.

9. Baines, A.D. Mechanisms of perfused kidney cytoprotection by alanine and glycine / A.D. Baines, N. Shaikh, P. Ho // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 1990. – №259 (1). – P. 80–87.

10. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes / J. Pedraza-Chaverri [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2000. – №29. – P. 602–611.

11. Guo, X. How to prevent, recognize, and treat drug-induced nephrotoxicity / X. Guo, C. Nzerue // Cleve Clin. J. Med. – 2002. – №69(4). – P. 289–297.

12. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase / N. Avissar [et al.] // Am. J. Physiol. – 1994. – № 266. – P.

367–375.

13. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin / E. Ozbek [et al.] // BJU Int. – 2000. – №85. – P. 742–746.

14. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure / R. Baliga [et al.] // Drug Metab. Rev. – 1999. – №31(4). – P. 971–977.

15. Price, K.E. Aminoglycoside research: prospects for development of improved agents / K.E. Price // Antimicrob. Agents Chemother. – 1986. – №29. – P. 543–548.

16. Senthilkumar R. Protective effect of glycine supplementation on the levels of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the erythrocyte of rats with alcohol-induced liver injury / R. Senthilkumar, M. Sengottuvelan, N. Nalini // Cell Biochem. Funct. – 2004. – № 22 (2). – P. 123–128.

17. Sha, S.H. Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin / S.H. Sha, J. Schacht // Free Radic. Biol. Med. – 1999. – №26. – P. 341–347.

18. Silverblatt, F.J. Autography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell / F.J. Silverblatt, C. Kuehn // Kidney Int. – 1979. – №15. – P. 335–345.

19. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats / A. Erdem [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2000. – №15. – P. 1175–1182.

20. Yang, C.L. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin / C.L. Yang, X.H. Du, Y.X. Han // Ren. Fail. – 1995. – №17. – P. 21–26.

POSSIBILITIES OF GLYCINE AS CYTOPROTECTOR AT GENTAMICIN-INDUCED NEPHROPATHY IN EXPERIMENT

S.M. Napalkova, O.S. Selivanova

Ulyanovsk State University

Nephroprotective properties of glycine were studied from gentamicin-induced nephropathy. It was established that administration of glycine protected from nephritic insufficiency, positively influenced on structural changes, prevented development of oxidative stress and decrease antioxidative enzymes activity in kidney of rats.

Keywords: gentamicin, nephropathy, glycine, oxidative stress.