

ГУМИНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК ФАКТОР ЗАЩИТЫ ОТ НЕФРОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕНТАМИЦИНА

© 2011 Л.Е. Меньших, А.В. Дубищев

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 01.10.2011

В работе изучено нефропротекторное действие гуминовых кислот, выделенных из гуминовых веществ иловых сульфидных грязей, при гентамициновом поражении почек. Проведено функциональное и патоморфологическое исследование. Препарат может быть перспективным для дальнейшей разработки в качестве мочегонного и нефропротекторного средства с калийсберегающими свойствами.

Ключевые слова: *гуминовые кислоты, почки, гентамицин, нефропротекторное действие*

Важнейшей задачей медицинской и фармацевтической науки является поиск эффективных лекарственных средств на основе природных биологически активных веществ. И это не удивительно, потому что лекарственные средства природного происхождения способны во много раз повышать результативность оказания медицинской помощи. К таким природным источникам относятся и лечебные грязи (пелоиды). С данной точки зрения наше внимание привлекли иловые сульфидные грязи, наиболее распространенные в Российской Федерации. Преобладающим компонентом иловых сульфидных грязей являются гуминовые кислоты [1, 3].

Объектом нашего исследования явились гуминовые кислоты, выделенные из гуминовых веществ низкоминерализованных иловых сульфидных грязей санатория «Сергиевские минеральные воды» Самарской области. Одной из главных проблем на пути разработки теории и практики применения гуминовых кислот является недостаточная изученность биологической активности, которая обуславливает их терапевтическую эффективность. Установлено, что препараты гуминовых кислот сульфидных грязей относятся к IV классу токсичности, обладают противовоспалительной, антиоксидантной активностью. В хронических экспериментах на крысах установлено, что гуминовые кислоты стимулируют экскреторную функцию почек, увеличивают выделение из организма воды, натрия, при этом возрастает клубочковая фильтрация. Положительным моментом в действии гуминовых

кислот является антикалиуретический эффект. С учетом вышеуказанной активности препарата было сделано предположение о терапевтической эффективности гуминовых кислот при экспериментальной почечной недостаточности.

Цель работы: исследование нефропротекторного действия гуминовых кислот при гентамициновом поражении почек.

Методы исследования. Возможный нефропротекторный эффект гуминовых кислот был изучен в хронических экспериментах с моделированием гентамициновой нефропатии. Острая токсическая почечная недостаточность моделировалась семидневным внутрибрюшинным введением крысам гентамицина в дозе 50 мг/кг [5]. Опытным животным одновременно с антибиотиком вводились ежедневно гуминовые кислоты в дозе 7,5 мг/кг. После введения препаратов животные получали водную нагрузку в количестве 3% от массы тела и помещались в обменные клетки на сутки для сбора мочи. Ежедневно определялась экскреция воды, натрия, калия. Для оценки тяжести почечной недостаточности за 1, 3, 5 и 7 сутки экспериментального периода в моче регистрировалось содержание креатинина, мочевины уреазно-глутаматдегидрогеназным методом с фотометрией при длине волны возбуждения 340 нм, общего белка методом окрашивания его при взаимодействии с бромфеноловым синим с последующей фотометрией при длине волны возбуждения 620 нм.

Для морфологического исследования у крыс под эфирным наркозом забирали обе почки, которые фиксировали в 12% растворе нейтрального формалина в течение 2-х суток. После фиксации материал промывали проточной водой в течение 24-х часов. Обезжиривание и обезвоживание материала проводили в

Меньших Людмила Евгеньевна, аспирантка. E-mail: Luydik13@mail.ru

Дубищев Алексей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии

спиртовых растворах (C_2H_5OH) возрастающей концентрации (70^0 , 80^0 , 96^0 и абсолютном спирте по 2-3 часа в каждом растворе) с дальнейшей заливкой в парафин [4]. Срезы толщиной 5 мкм изготавливали на роторном микротоме Sakura с дальнейшим окрашиванием гематоксилином и эозином. Препараты изучали светооптически с помощью световых микроскопов Ломо Микмед-1 и Olympus CX21FS1 при увеличениях 100 (ок.-10, об.- 10) и 400 (ок. – 10, об.- 40). Микрофотографии изготавливали при помощи цифрового фотоаппарата Nikon Coolpix P5000.

Результаты исследования. Оказалось, что токсическое действие гентамицина на почки появляется уже на 3 сутки ежедневного введения препарата (табл. 1). Развиваются характерные признаки токсической полиурии, при этом существенно возрастает экскреция воды (в 1,7 раза), натрия (в 1,4 раза), калия (в 1,3 раза), креатинина (в 1,3 раза). Полиуретический эффект сохраняется и на 5 сутки. Выведение воды, электролитов, креатинина по сравнению с контролем остается повышенным

соответственно в 1,4; 1,7; 1,5 и 1,6 раза. К концу периода наблюдения (7 сутки) признаки токсической нефропатии становятся максимальными, и это проявляется в более выраженной экскреторной функции. Диурез остается увеличенным в 2,6 раза, натриурез – в 1,9 раза, калиурез – в 1,6 раза, креатининуризм – в 1,8 раза. Полученные результаты подтверждают данные, ранее полученные на кафедре о нефротоксическом действии гентамицина, характерным признаком которого является поражение нефронов, что приводит к угнетению канальцевой реабсорбции воды и электролитов. Одновременно поражаются и почечные клубочки, что сопровождается возрастанием клубочковой фильтрации [2]. На 5 и 7 сутки увеличивается потеря белка с мочой с $0,6 \pm 0,04$ до $0,76 \pm 0,03$ мг ($P < 0,05$) и с $0,61 \pm 0,03$ до $0,82 \pm 0,03$ мг ($P < 0,05$) соответственно. Параллельно возрастает и экскреция мочевины с $1,30 \pm 0,13$ до $1,68 \pm 0,11$ мг ($P < 0,05$) и с $1,35 \pm 0,13$ до $1,90 \pm 0,07$ мг ($P < 0,05$). Последние два критерия свидетельствуют о нефротоксичности антибиотика.

Таблица 1. Влияние ежедневного подкожного введения гуминовых кислот в дозе 7,5 мг/кг на суточную экскреторную функцию почек в первые 7 дней развития токсической гентамициновой нефропатии ($M \pm m$, $n=10$).

Показатели		Дни эксперимента			
		1	3	5	7
диурез, мл/сут.	К	$1,36 \pm 0,08$	$1,28 \pm 0,13$	$1,37 \pm 0,11$	$1,31 \pm 0,07$
	Г	$1,55 \pm 0,09$	$2,14 \pm 0,12^*$	$2,92 \pm 0,21^*$	$3,51 \pm 0,23^*$
	Г+ГК	$1,68 \pm 0,09$	$3,05 \pm 0,21^*$	$4,07 \pm 0,40^*$	$4,71 \pm 0,49^*$
экскреция натрия, мкм/сут.	К	$186,41 \pm 22,54$	$190,38 \pm 21,07$	$190,08 \pm 15,32$	$188,96 \pm 14,73$
	Г	$188,40 \pm 23,74$	$261,42 \pm 24,49^*$	$320,73 \pm 42,02^*$	$355,64 \pm 9,86^*$
	Г+ГК	$187,79 \pm 16,08$	$351,95 \pm 26,30^*$	$466,80 \pm 39,63^*$	$501,29 \pm 26,41^*$
экскреция калия, мкм/сут.	К	$81,84 \pm 5,01$	$85,90 \pm 7,85$	$84,52 \pm 4,78$	$84,27 \pm 2,79$
	Г	$91,43 \pm 3,90$	$111,51 \pm 6,08^*$	$127,36 \pm 6,45^*$	$136,07 \pm 3,54^*$
	Г+ГК	$85,07 \pm 6,49$	$93,78 \pm 3,77^*$	$95,39 \pm 6,12^*$	$99,05 \pm 8,60^*$
экскреция креатинина, мг/сут.	К	$4,16 \pm 0,32$	$4,12 \pm 0,38$	$4,17 \pm 0,48$	$4,10 \pm 0,26$
	Г	$4,43 \pm 0,28$	$5,39 \pm 0,83^*$	$6,53 \pm 0,50^*$	$7,56 \pm 4,48^*$
	Г+ГК	$4,47 \pm 0,32$	$6,74 \pm 0,75^*$	$8,41 \pm 0,72^*$	$10,42 \pm 1,15^*$

Примечание: К – контроль, Г – гентамицин, Г+ГК – комбинация гуминовых кислот с гентамицином; Г* – по сравнению с контролем; Г+ГК* – по сравнению с гентамицином

Одновременно с гентамицином многодневное введение гуминовых кислот предупреждает развитие нефротоксичности. Хотя диурез остается повышенным по сравнению с показателями, полученными только при назначении гентамицина а 3, 5 и 7 дни (в 1,4 раза), натриурез соответственно в 1,3; 1,5 и 1,4 раза, креатининуризм в 1,3; 1,3 и 1,4 раза, тем не менее другие показатели – экскреция белка и мочевины изменяются в положительном направлении. Выведение белка с мочой на 5 и 7 сутки наблюдения уменьшается соответственно с

$0,76 \pm 0,03$ до $0,67 \pm 0,03$ мг ($P < 0,05$) и с $0,82 \pm 0,03$ до $0,73 \pm 0,02$ мг ($P < 0,05$). Выведение с мочой мочевины повышается с $1,30 \pm 0,13$ до $1,68 \pm 0,11$ мг ($P < 0,05$) и с $1,35 \pm 0,13$ до $1,90 \pm 0,07$ мг ($P < 0,05$). Эти показатели свидетельствуют об относительной сохранности почечных канальцев и клубочков.

При микроскопическом исследовании почек установлено, что в контрольной группе у животных отмечается типичная структура почки с выраженными корковым и мозговым слоями. В целом структура нефронов – без

особенностей. Определяются почечные клубочки, окруженные капсулой Шумлянско-Боумана, и почечные канальцы. На большом увеличении (x400) в клубочках в просвете капилляров видны эритроциты, в норме не выходящие за предел капиллярных клубочковых петель и капсулы. Также четко визуализируются проксимальные и дистальные почечные канальцы: у проксимальных канальцев почечный эпителий высокий, имеет кубическую форму, цитоплазма содержит светлые или

бледно-коричневые вакуоли, накапливающие секретируемые вещества. Для проксимальных канальцев характерен малый диаметр просвета. У дистальных почечных канальцев эпителий более тонкий, плоский, диаметр просвета больше, с прозрачным содержимым, в цитоплазме канальцевого эпителия гранул не выявляется. В норме ни проксимальные, ни дистальные канальцы, ни петли Генле не расширены (рис. 1).

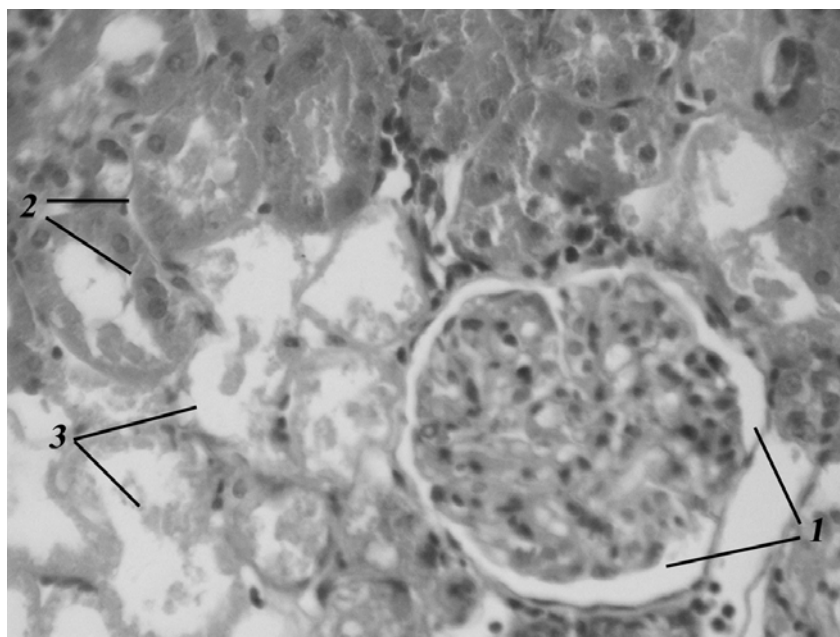


Рис. 1. Почка в контроле. Интактный клубочек (1), просвет между клубочком и капсулой Шумлянско-Боумана (2). Проксимальные (3) и дистальные (4) почечные канальцы. Окраска гематоксилином и эозином. x 400.

При 7-дневном введении гентамицина у животных микроскопически отмечаются выраженные значительные повреждения как клубочкового, так и тубулярного отделов нефрона. Характерными для данной серии являются множественные обильные кровоизлияния в корковом слое и на границе коркового и мозгового слоев, массивная инфильтрация мононуклеарными лейкоцитами интерстиция почки, наличие множественных тубулярных некрозов. В целом выражена картина серозно-экссудативного воспаления: кровоизлияния и нейтрофильно-лимфоцитарные инфильтраты в почечной паренхиме имеют массивный характер.

Для тубулярного аппарата изменения, вызванные гентамицином, протекают по типу острой тубулопатии: отмечается вакуолизация эпителия проксимальных канальцев с развитием тяжелой гиалиново-капельной и гидропической дистрофии, множественные некрозы эпителиальных клеток и целых канальцев с нарушением их целостности вплоть до полного разрушения. Ядра одних клеток проксимальных

канальцев набухшие, некоторых клетках отмечается кариопикноз и кариорексис ядер, в других клетках - кариолизис с гомогенизацией кариоплазмы и цитоплазмы и формированием некрозов. Просвет канальцев резко сужен, зачастую не определяется из-за заполнения слущенным эпителием, белками в виде хлопьев и солями. Клетки эпителия дистальных канальцев в состоянии преимущественно гидропической (баллонной) дистрофии, некротические явления выражены сильнее, чем в проксимальных канальцах, часто встречаются участки с частично или полностью разрушенными дистальными канальцами. Характерны также отек и набухание базальных мембран канальцевого эпителия (рис. 2). Отмечается резкое расширение дистальных отделов нефрона с отеком и набуханием эпителия собирательных трубочек и множественными интерстициальными кровоизлияниями. В просвете собирательных трубочек отмечается скопление белковых масс и кристаллов солей, идет агрегация белков с образованием белковых цилиндров.

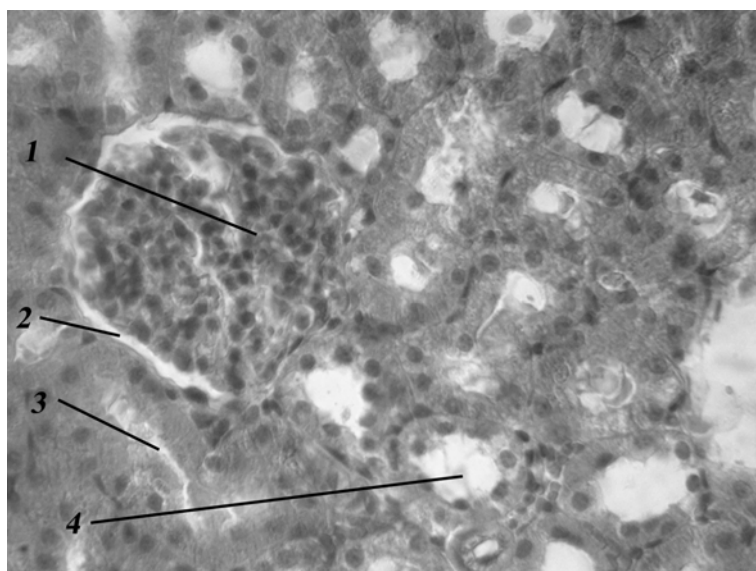


Рис. 2. Почка под воздействием гентамицина. Отек и расщепление капсулы клубочка, экстракапиллярный отек (1), некроз проксимальных (2) и практически полное разрушение дистальных почечных канальцев (3). Окраска гематоксилином и эозином. x400.

При обзорной микроскопии почек животных после применения комбинации препаратов гентамицина и гуминовой кислоты отмечается наличие патологических изменений, схожих с предыдущей опытной серией, обусловленных воздействием гентамицина, но в данной группе за счет сочетанного использования гуминовой кислоты данные изменения выражены в меньшей степени. В проксимальных отделах многих нефронов сохраняются явления капиллярной и экстракапиллярной гломерулопатии со спадением и деструкцией капиллярных петель клубочков, экстракапиллярным отеком, набуханием и отеком капсулы

с белковой дистрофией нефротелия. Наряду с этим выявляются практически интактные неизмененные клубочки. Встречаются точечные кровоизлияния в интерстиции на границе коркового и мозгового слоев и единичные лейкоцитарные инфильтраты. По-прежнему выражен отек и резкое расширение дистальных канальцев и петель Генле с содержанием в их просвете хлопьев белка и минералов. В эпителии дистальных канальцев сохраняется состояние гидропической дистрофии, однако визуально некротические явления выражены в меньшей степени, чем в серии с использованием только гентамицина (рис. 3).

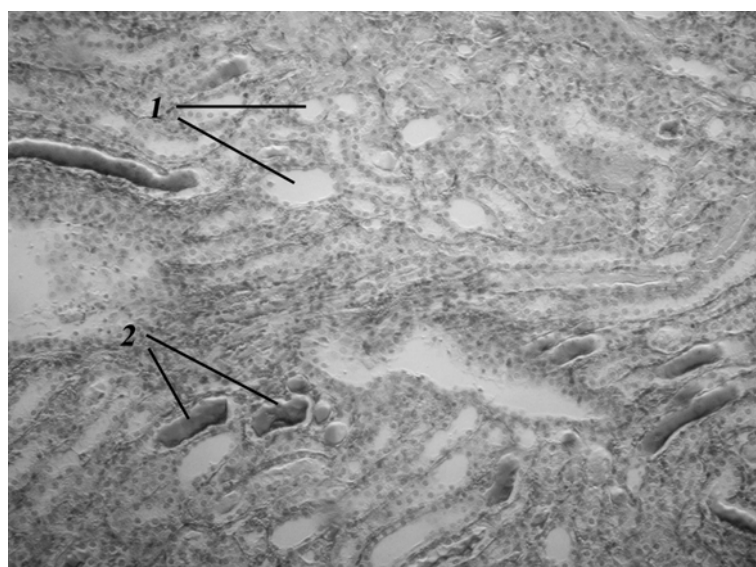


Рис. 3. Почка под воздействием гентамицина и гуминовой кислоты. Расширение дистальных отделов отдельных нефронов (1), белковые цилиндры в просвете собирательных трубочек (2). Окраска гематоксилином и эозином. x100.

Обсуждение и выводы. Известно, что гентамицин в клинических условиях обладает нефротоксическим действием, вызывая полиуретическую форму почечной недостаточности. В экспериментах на крысах токсическое действие гентамицина также проявляется в виде ослабления канальцевой реабсорбции воды, натрия и калия, что и выражается в увеличении почечной экскреторной функции. Гуминовые кислоты, назначаемые с гентамицином парентерально в течение 7 дней, действуют как диуретик, дополнительно увеличивают выведение из организма воды, натрия, креатинина, ослабляют калиуретический эффект, стимулируют клубочковую фильтрацию. Тем самым в нефронах создается защитный гидродинамический эффект: увеличение внутреннего диаметра канальцев, тока внутриканальцевой жидкости, уменьшения коллапсирования сегментов и взаимного сдавливания и повреждения нефроцитов. Кроме того, о нормализации выделительной функции почек свидетельствует и возрастание выведения креатинина (3, 5, 7 сутки), мочевины (5,7 сутки) и уменьшение выделения белка с мочой (5 и 7 сутки). Дополнительным положительным моментом в действии препарата является калийсберегающий эффект (3, 5 и 7 сутки).

Патоморфологическое исследование подтверждает, что изолированное введение экспериментальным животным гентамицина оказывает максимальный повреждающий эффект на почечную ткань с нарушением функций

как клубочкового, так и канальцевого аппарата, а также дистальных отделов нефронов, формированием интенсивной воспалительной реакции и образованием множественных некрозов. При сочетанном введении крысам гентамицина вместе с гуминовой кислотой нефротоксичный эффект гентамицина частично нивелируется, приводя к снижению выраженности всех вышеописанных процессов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аввакумова, Н.П. Биохимические аспекты терапевтической эффективности гумусовых кислот лечебных грязей / Н.П. Аввакумова. – Самара: Перспектива; СамГМУ, 2002. 124 с.
2. Дубищев, А.В. Новое представление о механизме регуляции канальцевого транспорта натрия в нефронах / А.В. Дубищев, Е.Н. Зайцева // Актуальные вопросы последипломного образования и здравоохранения. Юбилейный сборник научных работ. – Самара, 2008. С. 89.
3. Косьянова, З.Ф. Химическая характеристика и биологическая активность гумусовых кислот некоторых лечебных грязей: автореф. дис. канд. биол. наук: 04.00.03 / З.Ф. Косьянова. – М., 1985. 20 с.
4. Меркулов, Г.А. Курс патологистологической техники. – Л., 1969. 423 с.
5. Панин, В.П. Анализ эффективности фитопрепаратов при острой почечной недостаточности по критерию NO-эксcretорной активности / В.П. Панин, А.В. Дубищев, В.А. Куркин // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Сборник научных трудов, выпуск 64. – Пенза, 2009. С. 440-442.

HUMIC ACIDS AS THE FACTOR OF PROTECTION AGAINST GENTAMYCIN NEPHROTOXICAL ACTION

© 2011 L.E. Menshikh, A.V. Dubishchev

Samara State Medical University

In work it is studied nephroprotective action of humic acids allocated from humic substances of silt sulphidic dirt, at nephros affection by gentamycin. It is spent functional and patho-morphological research. The preparation can be perspective for the further working out as diuretic and nephroprotective agent with potassium save up properties.

Key words: *humic acids, nephros, gentamycin, nephroprotective action*

Lyudmila Menshikh, Post-graduate Student. E-mail:

Luydik13@mail.ru

Aleksey Dubishchev, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Pharmacology Department