

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА АНТИБИОТИКОВ И ФТОРХИНОЛОНОВ ПРИ НЕОБСТРУКТИВНОМ ПИЕЛОНЕФРИТЕ

А.И. Лазарев, Г.В. Сипливый, А.В. Кукурека, Л.Е. Сипливая

Курский государственный медицинский университет, г.Курск

В исследованиях на крысах показано, что введение антибиотиков-аминогликозидов или фторхинолонов включенных в эритроцитарные или лейкоцитарные носители при пиелонефрите снижало количество очагов скопления лейкоцитов в почках, повышало или нормализовало уровень ферментов в органе, выделительную функцию почек, нарушенные иммунометаболические показатели.

Ключевые слова: эксперимент, клеточные носители, антибиотики, пиелонефрит

Согласно статистике в среднем 1% людей на земле каждый год заболевают пиелонефритом. Пиелонефрит имеет тенденцию к длительному течению, хронизации процесса и является причиной глубоких и необратимых изменений в почках, что в свою очередь вызывает системные иммунометаболические нарушения [1].

В последние годы для достижения выраженного эффекта с минимальным побочным действием и максимальной концентрацией препарата в очаге воспаления разработан новый метод эфферентной терапии – направленный транспорт антибиотиков с использованием клеточных носителей, полученных из форменных элементов крови [3]. Отсутствие достоверных данных о возможности использования иммобилизованных в клеточных носителях антибиотиков при пиелонефрите предопределяет целесообразность изучения эффективности и иммунометаболической активности некоторых антибиотиков и фторхинолонов, включенных в эритроцитарные и лейкоцитарные носители.

Материалы и методы

Исследования проведены на крысах породы «Вистар». Воспалительный процесс в почках крыс моделировали совместным введением арахидоновой кислоты и микробного агента *Staphylococcus aureus*. Арахидоновую кислоту вводили внутривенно в дозе 2,5 мг/кг массы тела ежедневно 1 раз в сутки в течение 10 дней, на 10-е сутки эксперимента в яремную вену вводили 0,5 мл взвеси культуры *Staphylococcus* в количестве $1 \cdot 10^8$ микробных тел [1].

Для включения антибиотиков и фторхинолонов в эритроцитарные носители (ЭН) использовали метод гипоосмотического гемолиза в модификации [2]. Для включения антибиотиков и фторхинолонов в лейкоцитарные носители (ЛН) использовали методику Лохвицкого С.В. [4]. В отдельных случаях для повышения связывания антибиотиков лейкоцитами в инкубационную среду добавляли АТФ в количестве 0,5 мл. В работе использованы отечественные препараты гентамицин,

амикацин, норфлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин. Гентамицин, амикацин и фторхинолоны вводили внутримышечно пятикратно с интервалом 24 часа в разовых дозах гентамицин 20 мг/кг, амикацин 30 мг/кг, фторхинолоны 3 мг/кг. Разовые дозы гентамицина и амикацина, вводимых в ЭН и ЛН, составили 20 мг/кг и 15 мг/кг, фторхинолонов 5 мг/кг. ЭН и ЛН с включенными антибиотиками вводили внутривенно двукратно.

Состояние почек оценивали с помощью гистологических и энзиматических исследований. Для морфологических исследований ткань почки фиксировали в 10% формалине, заливали парафином, срезы окрашивали гематоксилин-эозином, особое внимание уделяли наличию в мозговом слое почек очагов скопления лейкоцитов. Энзиматические исследования были направлены на определение активности в почечной ткани сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), глутаматдегидрогеназы (ГДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ) по унифицированным методам с использованием стандартных наборов реактивов. Выделительную функцию почек оценивали по концентрации мочевины и креатинина [8].

Гуморальный иммунный ответ (ГИО) индуцировали однократным внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (ЭБ) в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток на 0,1 кг массы тела. Интенсивность ГИО оценивали на пятые сутки после иммунизации по количеству в селезенке клеток образующих антитела (АОК) [6]. Клеточное звено иммунитета оценивали по выраженности гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [9]. Функционально-метаболическую активность нейтрофилов периферической крови определяли по величинам фагоцитарного индекса (ФИ), фагоцитарного числа (ФЧ) и индекса активности фагоцитов (ИАФ) [7], показателей спонтанного и индуцированного зимозаном НСТ-теста, окислительному резерву нейтрофилов (ОРН) [10].

Антиоксидантный потенциал эритроцитов оценивали по активности супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионредуктазы (ГР). Выраженность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах оценивали по содержанию ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА) [4].

Исследования на животных проводили с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных целей (г.Страсбург, Франция, 1986). Крыс выводили из опыта декапитацией под эфирным наркозом.

Результаты обрабатывали статистически. Вычисляли средние арифметические величины определявшихся показателей и их стандартные ошибки. Существенность различий средних величин оценивали по критериям Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

Морфологические и энзиматические исследования почек при введении арахидоновой кислоты и стафилококка показали выраженные очаговые скопления лейкоцитов в мозговом веществе почек, отмечалось уменьшение активности в органе СДГ, ГДГ и ЩФ в 1,9-2,3 раза, активность ЛДГ сохранялась высокой. Снижалась выделительная функция почек, в крови отмечалось повышенное содержание мочевины и креатинина соответственно (в контрольной группе $132,4 \pm 13,2$ и $11,8 \pm 1,4$ ммоль/л, а в опытных $232,3 \pm 24,1$; $289,4 \pm 25,6$ и $21,5 \pm 2,9$; $34,5 \pm 3,1$ ммоль/л). В группах животных с пиелонефритом установлено снижение ФЧ, ФИ, НСТ спонтанного и индуцированного зимозаном ОРН, выраженности

ГИО и ГЗТ, активности СОД и ГР, и повышение содержания АГП и МДА в эритроцитах.

Введение свободных антибиотиков или фторхинолонов опытным крысам с пиелонефритом нормализовало показатели мочевины и креатина на 12-10 сутки, не изменяло морфологические и энзиматические показатели в почках, снижало показатели фагоцитоза, подавляло ГИО и ГЗТ, усиливало ПОЛ.

Введение антибиотиков или фторхинолонов включенных в ЭН здоровым животным не влияло на ФМА, ГИО и ГЗТ, и снижало иммунодефицит у крыс с пиелонефритом. У животных этой группы повышались, но не нормализовались ИАФ и ОРН (табл. 1). В почках отмечено снижение очагов скопления лейкоцитов, повышение уровня СДГ, ГДГ, ЩФ. Выделительная функция почек нормализовалась на 9-8 сутки. Инъекции гентамицина и амикацина или фторхинолонов включенных в ЛН (введенных в присутствии или отсутствии в инкубационной среде АТФ) нормализовали показатели мочевины и креатинина на 6-5 сутки, существенно снижали количество и выраженность очагов скопления лейкоцитов, нормализовали уровень ферментов в почках, показатели фагоцитоза, ГИО, ГЗТ крыс с пиелонефритом и не изменяли их у здоровых животных (табл. 2). При этом не установлено достоверной разницы между группами животных, получавших антибиотики аминогликозиды или фторхинолоны включенные в ЛН.

Таблица 1

Изменение ФМА, ГИО, ГЗТ животных с необструктивным пиелонефритом, при введении иммобилизованных в ЭН аминогликозидов и фторхинолонов

№	Группа	ИАФ	ОРН	АОК	РМЛ
1	Контроль (здоровые крысы)	64,3±6,2	17,8±1,5	29,1±2,8	5,4±0,4
2	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк	48,2±4,1* ¹	11,2±1,2* ¹	21,2±1,9* ¹	4,2±0,3* ¹
3	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк + ЭН с гентамицином	54,6±3,3* ²	15,1±1,2* ²	25,4±2,1* ^{1,2}	4,9±0,4* ²
4	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк + ЭН с амикацином	55,2±3,5* ²	14,8±1,1* ²	25,9±1,9* ²	4,8±0,3* ²
5	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк + ЭН с офлоксацином	53,8±3,1* ²	14,9±1,3* ²	24,2±2,1* ²	4,7±0,5* ²

Примечание: * и № и цифра рядом указывают на достоверность различий между группами при $p < 0,05$; количество животных в группах 8-9.

Таблица 2

Изменение ФМА, ГИО, ГЗТ животных с необструктивным пиелонефритом, при введении иммобилизованных в ЛН аминогликозидов и фторхинолонов

№	Группа	ИАФ	ОРН	АОК	РМЛ
1	Контроль (здоровые крысы)	64,3±6,2	17,8±1,5	28,4±2,2	5,4±0,4
2	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк	48,2±4,1* ¹	11,2±1,2* ¹	20,1±1,7* ¹	4,2±0,3* ¹
3	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк + ЛН с гентамицином	59,7±4,1	16,8±1,1	31,2±2,9	6,0 ±0,5
4	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк + ЛН с амикацином	59,3±4,3	16,1±1,2	25,1±3,1	4,9 ±0,4
5	Введение арахидоновой кислоты + стафилококк + ЛН с офлоксацином	66,8±4,8	16,9±1,4	27,2±3,4	6,2±0,6

Примечание: * и № и цифра рядом указывают на достоверность различий между группами при $p < 0,05$; количество животных в группах 8-9.

Введение ЭН и ЛН с антибиотиками - аминогликозидами значительно уменьшало, а введение ЛН с антибиотиками и АТФ нормализовало антиоксидантный потенциал эритроцитов, интенсивность ПОЛ.

Выводы

1. При экспериментальном необструктивном пиелонефрите снижалась выделительная функция почек, уменьшалась активность СДГ, ГД и ЩФ, появлялись скопления лейкоцитов в мозговом веществе почек, снижались ФЧ, ФИ, НСТ спонтанный и индуцированный зимозаном, ГИО и ГЗТ, антиоксидантный потенциал эритроцитов, повышалось ПОЛ в эритроцитах.

2. Введение антибиотиков-аминогликозидов или фторхинолонов крысам с пиелонефритом нормализовало выделительную функцию почек на 12-10 сутки, не изменяло морфологические и энзиматические показатели в почках, снижало показатели фагоцитоза и подавляло ГИО и ГЗТ, усиливало ПОЛ в эритроцитах.

3. Введение антибиотиков или фторхинолонов включенных в ЭН или ЛН крысам с пиелонефритом, соответственно, нормализовало выделительную функцию почек на 9-8 и 6-5 сутки, снижало количество очагов скопления лейкоцитов и повышало или нормализовало уровень ферментов в органе,

показатели фагоцитоза, ГИО и ГЗТ, нормализовало ПОЛ и антиоксидантный потенциал в эритроцитах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Есилевский, Ю.М. Патогенез пиелонефрита/ Ю.М. Есилевский – М.: МЕДпресс-информ, 2007 – 362с.
2. Жумадилов Ж.Ш. Особенности включения некоторых антибиотиков в эритроцитарные тени – систему целенаправленной доставки химиотерапевтических препаратов/ Ж.Ш. Жумадилов, Р.В. Макаренко// Антибиотики и химиотерапия.-1990.-Т35, №11.-С.54-56.
3. Костюченко А.Л. Эфферентная терапия/ А.Л. Костюченко – СПб,: Фолиант, 2000. – 432с.
4. Лохвицкий С.В. Клиническая фармакокинетика антибиотиков при введении их в клеточной массе во время плазмафереза/ С.В. Лохвицкий и др. // Здравоохран. Казахстана.- 1992.- № 8. – С.22-24.
5. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных хроническими заболеваниями печени/ Е.В. Макаренко// Лабораторное дело.-1988.-№11.- С.48-50.
6. Мальберг К. Метод локального гемолиза // Иммунологические методы / К. Мальберг, Э. Зигль; Под ред. Х. Фримеля: Пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – с.57 – 72.
7. Медведев А.Н. Способ исследования поглотительной фазы фагоцитоза/ А.Н. Медведев, В.В. Чаленко//Лаб. дело.-1991.-№2-С. 19.
8. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник/ ред. В.В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 365с.
9. Федосеева В.Н. Руководство по иммунологическим и аллергологическим методам в клинических исследованиях/ В.Н. Федосеева и др. - ПРОМЕДЕК, Москва – 1993. – 320с.
10. Щербаков В.И. Применение НСТ-теста для оценки чувствительности нейтрофилов к стимуляторам/ В.И. Щербаков// Лаб.дело. – 1989. - №2. – С. 30-33.

EXPERIMENTAL BASIS OF CELL CARRIERS USING FOR DIRECTED TRANSPORT OF ANTIBIOTICS AND FLUOROQUINOLONE IN NON-OBSTRUCTIVE PYELONEPHRITIS

A.I. Lazarev, G.V. Sipliviyi, A.V. Kukureka, L.E. Siplivaya

It was shown in investigations on rats that introduction of aminoglycoside antibiotics or fluoroquinolone, included into erythrocyte or leukocyte carriers in pyelonephritis, decreased amount of leukocyte accumulation centers in kidneys increased or normalized the level of enzymes in the organ, excretory function of kidneys, impaired immunometabolic parameters.