

УДК 616.282.7—084:615.779.931

Э. А. Бакай, Л. Б. Несчетная

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ НИКОТИНАМИДА И ЦИТОХРОМА С ПРИ АМИНОГЛИКОЗИДНОМ ОТОТОКСИКОЗЕ

Ототоксические свойства аминогликозидных антибиотиков установлены многочисленными клиническими и экспериментальными исследованиями. В связи с этим применение антибиотиков этого ряда имеет существенные ограничения в клинической практике. Однако высокая эффективность аминогликозидов для лечения некоторых заболеваний указывает на целесообразность их применения такими способами, которые обеспечивают снижение риска возникновения осложнений внутреннего уха. Исследования по использованию некоторых фармакологических препаратов для ослабления ототоксичности аминогликозидов проведены многими авторами. Было показано профилактическое действие комплекса АТФ, цистеина и никотиновой кислоты [1], кокарбоксилазы [5], озотина [9], цитохрома С [10]. Однако, несмотря на некоторый положительный результат, проблема поиска новых путей и средств снижения ототоксичности остается актуальной. Патогенез антибиотикового поражения слухового анализатора описан многими авторами [3, 13, 14], но вопрос о первичных биохимических изменениях в структурах внутреннего уха остается дискуссионным.

Установлено [11], что под действием аминогликозидных антибиотиков в улитке нарушаются процессы окисления субстратов тканевого дыхания. Учитывая значительное накопление в органах и тканях никотинамидадениндинуклеотида (НАД) при введении никотинамида [2, 6, 12], а также роль цитохромов в процессах тканевого дыхания, мы использовали с целью коррекции протекания окислительно-восстановительных реакций во внутреннем ухе никотинамид и цитохром С.

Методика исследований

Опыты проведены на 45 морских свинок массой от 100 до 250 г нормальным рефлексом Прейера (подергивание ушных раковин в ответ на звуковой щелчок), которые были разделены на семь групп. Животным первых трех групп (по семь в каждой группе) вводили мономицин в дозе 100 мг/кг, из них — первая группа получала только антибиотик, вторая — антибиотик и никотинамид, третья — антибиотик и цитохром С. Исследование трех последующих групп животных (по шесть свинок в каждой группе) проводили по такому же плану, но доза мономицина составляла 250 мг/кг. Седьмая группа животных, получавшая внутримышечно физиологический раствор, служила контролем (шесть свинок).

Никотинамид и цитохром С применяли в дозе 10 мг/кг. Как мономицин, так и протекторы вводили в течение десяти дней ежедневно внутримышечно. Через каждые три дня животных взвешивали для коррекции соотношения между массой тела и дозой вводимых лекарственных веществ.

Функциональное состояние периферического отдела слухового анализатора оценивали исследованием микрофонного и неврального компонентов суммарного ответа улитки, которое проводили через сутки после последней инъекции. Животных наркотизировали внутривенным введением этиламидом натрия из расчета 25 мг/кг.

Микрофонный потенциал (МП) улитки и потенциал действия (ПД) слухового нерва отводили от мембраны круглого окна, доступ к которому осуществляли оперативным путем через буллу височной кости. Отведение потенциалов было монополярным. Активный электрод, представляющий собой изолированную константановую проволоку диаметром 0,25 мм, помещали у края мембраны и прикрепляли к краю кости буллы цинк-цинковым клеем. Индифферентный электрод укрепляли на мышце в ране.

Изучение протективных свойств

Электрическую активность регистрировали частотой 500, 1000, 2000 Гц в ответ на воздействие звукового стимула с дискретным снижением амплитуды потенциалов осуществления [4, 7].

Резу

Регистрация МП у морских свинок показала, что амплитуда ответа улитки на звуковой стимул составляла 340 ± 18 и 280 ± 28 мкВ. Потенциал действия слухового нерва наблюдался на частотах 500, 1000, 2000 Гц.

Потенциал действия слухового нерва представлял собой суммарный ответ улитки на звуковой стимул. Амплитуда ответа улитки оценивали по амплитуде пика N_1 , величина которого составляла 88 дБ в среднем. С уменьшением дозы мономицина амплитуда N_1 закономерно снижалась: 25 ± 15 мкВ.

После десятидневного введения мономицина у морских свинок наблюдалось значительное снижение амплитуды ответа улитки на звуковой стимул ($p < 0,01$). Это отмечено при стимуляции улитки, на которую составляло от 80 до 100 дБ.

При анализе амплитуды ответа улитки на звуковой стимул в контрольной группе животных амплитуда ответа составляла 340 ± 21 мкВ. В группе животных, получавших мономицин, амплитуда ответа составляла 25 ± 15 мкВ. Это свидетельствует о том, что амплитуда ответа улитки на звуковой стимул в контрольной группе животных составляла от 80 до 100 дБ.

Аналогичные результаты были получены при исследовании амплитуды ответа улитки на звуковой стимул в контрольной группе животных. Амплитуда ответа составляла 340 ± 21 мкВ. В группе животных, получавших мономицин, амплитуда ответа составляла 25 ± 15 мкВ.

Порог возникновения ответа улитки на звуковой стимул в контрольной группе животных составлял от 80 до 100 дБ. В группе животных, получавших мономицин, порог возникновения ответа составлял от 80 до 100 дБ. Это свидетельствует о том, что порог возникновения ответа улитки на звуковой стимул в контрольной группе животных составлял от 80 до 100 дБ.

Электрическую активность улитки регистрировали в ответ на тональные послышки частотой 500, 1000, 2000, 4000, 6000 и 8000 Гц, а потенциал действия слухового нерва — в ответ на воздействие акустического фазопеременного щелчка, длительностью 0,15 мс с дискретным снижением интенсивности от 88 дБ через каждые 8 дБ. Регистрацию биопотенциалов осуществляли на установке, принципиально не отличающейся от описанной [4, 7].

Результаты исследований и их обсуждение

Регистрация МП улитки и ПД слухового нерва intactных морских свинок показала четкие стабильные ответы у большинства животных. Амплитуда МП улитки зависела от частоты подаваемого стимула. Потенциалы максимальной величины наблюдались в ответ на стимуляцию частотой 2000 и 4000 Гц, в среднем составляя $(\bar{x} \pm m)$ 340 ± 18 и 280 ± 28 мкВ ($n=12$) соответственно, минимальные значения наблюдались на частоте 8000 Гц (150 ± 13 мкВ).

Потенциал действия слухового нерва у intactных морских свинок представлял собой микрофонный и невральные компоненты суммарного ответа улитки. Функциональную активность слухового нерва оценивали по амплитуде наиболее стабильного компонента ответа — пика N_1 , величина которого составляла при интенсивности щелчка 88 дБ в среднем 425 ± 23 мкВ.

С уменьшением интенсивности звукового стимула амплитуда пика N_1 закономерно снижалась и при интенсивности 40 дБ составляла 25 ± 15 мкВ.

После десятидневного введения 100 мг/кг мономицина, хотя рефлекс Прейера у всех животных сохранялся положительным, наблюдалось значительное снижение МП улитки на всех исследуемых частотах ($p < 0,01$). Наибольшее падение амплитуды МП улитки было отмечено при стимуляции частотами 500 и 4000 Гц — на 57 и 55 % соответственно, на остальных исследуемых частотах снижение амплитуды составляло от 40 до 54 %.

При анализе изменений ПД слухового нерва оказалось, что снижение амплитуды компонента N_1 , развивающееся под действием мономицина, существенно зависит от интенсивности щелчка. При воздействии стимула интенсивностью 88 дБ амплитуда N_1 составила $(\bar{x} \pm m)$ 340 ± 21 мкВ, т. е. в среднем была на 20 % меньше, чем в группе контрольных животных. Существенно, что эта величина примерно в 2,5 раза меньше, чем падение амплитуды МП улитки при ее исследовании на всех частотах. Это свидетельствует о большей степени повреждения волоскового аппарата улитки, чем волокон слухового нерва, что согласуется с данными литературы [8].

Аналогичные результаты получены для интенсивности 80 дБ, где падение амплитуды пика N_1 составило 38 % при действии положительной фазы и 46 % — отрицательной. Однако при воздействии щелчками более низкой интенсивности снижение амплитуды компонента N_1 под действием мономицина прогрессивно увеличивалось по отношению к величине амплитуды этого компонента в контрольной группе животных, превосходя снижение амплитуды МП улитки.

Порог возникновения ПД слухового нерва у животных, получавших только мономицин, составлял 56 дБ, тогда как у intactных животных ответ наблюдался при интенсивности щелчка 40 дБ.

В группе животных, которым вводили параллельно с мономицином (в дозе 100 мг/кг) никотинамид, значения амплитуд МП улитки на всех исследуемых частотах достоверно не отличались от наблюдаемых у контрольных животных (рис. 1). Наибольшей величины МП был отмечен на частотах 4000 и 6000 Гц, где падение амплитуды под влиянием антибиотика практически отсутствовало.

Исследование потенциала действия слухового нерва показало, что в этих условиях сохранялась тенденция к уменьшению падения амплитуды компонента N_1 под действием мономицина с увеличением интенсивности щелчка. Звуковые стимулы интенсивностью до 80 дБ не вызывали существенного различия в изменениях значений амплитуды

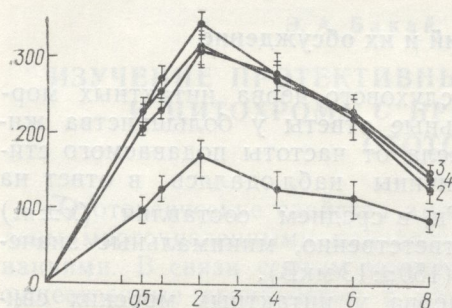


Рис. 1. Влияние никотинамида и цитохрома С на МП улитки при мономициновом ототоксикозе (100 мг/кг).

По горизонтали — частота тональных посылок (в кГц), по вертикали — усредненная амплитуда МП (в мВ), доверительные интервалы при 95 % вероятности. 1 — введение мономицина, 2 — параллельное введение мономицина и никотинамида, 3 — введение физиологического раствора, 4 — параллельное введение мономицина и цитохрома С.

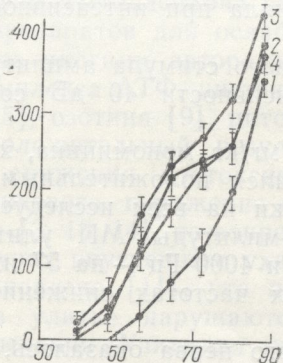


Рис. 2. Амплитуда усредненного N_1 ПД слухового нерва при воздействии положительной фазы акустического стимула (доверительные интервалы при 95 % вероятности). По горизонтали — интенсивность звукового стимула (в дБ), по вертикали — амплитуда (в мВ). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Рис. 3. Амплитуда усредненного N_1 ПД слухового нерва при воздействии отрицательной фазы акустического стимула.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

компонента N_1 в зависимости от фазы щелчка С увеличением интенсивности до 88 дБ угнетение компонента N_1 было несколько менее выраженным при стимуляции щелчком положительной фазы, чем отрицательной (9 и 19 % соответственно).

Регистрация ПД слухового нерва у животных, получавших мономицин и никотинамид, показала, что порог возникновения ответа при воздействии отрицательной фазы звукового стимула составлял 48 дБ у всех животных, а положительной — 40 дБ у некоторых животных, т. е. с увеличением интенсивности звукового стимула до 80 дБ амплитуда пика N_1 была существенно больше у животных, которым вводили параллельно с мономицином никотинамид, по сравнению с ПД у животных, не получавших последний. Однако при максимальной интенсивности щелчка, составляющей 88 дБ, амплитуда пика N_1 у животных этой группы достоверно не отличалась от наблюдаемой у животных, получавших только антибиотик.

При сравнении данных, касающихся изменений микрофонного потенциала улитки и потенциала действия слухового нерва, оказалось, что при больших интенсивностях щелчка падение амплитуды МП после

введения мономицина

чем амплитуды ко

Соотношения

которым вводили

максимальным н

значение, равное

ных частотах эфф

ставляла от 39 до

Для потенциа

компонентов N_1 у

ствие больших и

для положительн

звукового стимул

ности 80 дБ соста

Воздействие

72 дБ) выявило б

N_1 с использовани

до 52 %, особенно

В целом положите

был более значите

щелчка, чем отриц

Таким образо

амид обладает вы

дении слухового

защитное действи

улитки, который

ототоксикозе.

В группе живо

рофонный потенци

зарегистрирован.

Снижение амплитуды

тинамид, была вы

мономицина. У че

слухового нерва, ко

составляла от 25 до

вого нерва не были

Изучение отве

но под действием

параметров подверж

никотинамида. В те

ражены еще более

чие в снижении ам

100 мг/кг и антиби

составляло на всех

При регистрац

кой интенсивности

залась небольшой

интенсивностей щел

исследуемых групп

ной фазы щелчка и

Применение ци

дозе 250 мг/кг, так

зрения протективно

тырех животных эт

всех частотах, за ис

МП составляла от 1

интенсивности щелч

никновения ответа

существовал при нал

лика N_1 соответство

введения мономицина с никотинамидом происходит в меньшей степени, чем амплитуды компонента N_1 ПД слухового нерва.

Соотношение величин МП улитки между группами животных, которым вводили антибиотик и никотинамид и только антибиотик, было максимальным на частоте 4000 Гц и составляло 55 %, минимальное значение, равное 25 % — было отмечено на частоте 8000 Гц. На остальных частотах эффективность протективного действия никотинамида составляла от 39 до 48 %.

Для потенциала действия слухового нерва соотношение амплитуды компонентов N_1 у животных указанных опытных групп в ответ на действие больших интенсивностей щелчка (80—88 дБ) составляло 11 % для положительной фазы, а для отрицательной — при интенсивности звукового стимула 88 дБ практически равнялось нулю, при интенсивности 80 дБ составляло 21 %.

Воздействие меньших интенсивностей звукового стимула (48—72 дБ) выявило большее различие в снижении амплитуды компонента N_1 с использованием никотинамида и без него, которое составляло от 27 до 52 %, особенно в ответ на воздействие интенсивностью 64 и 54 дБ. В целом положительный защитный эффект от применения никотинамида был более значительно выражен при стимуляции положительной фазой щелчка, чем отрицательной.

Таким образом, как следует из полученных результатов, никотинамид обладает выраженными протективными свойствами при повреждении слухового анализатора мономицином в дозе 100 мг/кг, причем защитное действие его более выражено для волоскового аппарата улитки, который является наиболее уязвимым при аминогликозидном ототоксикозе.

В группе животных, получавших мономицин в дозе 250 мг/кг, микрофонный потенциал улитки и потенциал действия слухового нерва не зарегистрирован. Однако у животных, получавших параллельно никотинамид, была выявлена различная степень угнетающего действия мономицина. У четырех животных при отсутствии МП отмечался ПД слухового нерва, который, однако, имел низкие значения: амплитуда его составляла от 25 до 75 мкВ. У двух животных МП улитки и ПД слухового нерва не были зарегистрированы.

Изучение ответов улитки и слухового нерва в таких же условиях, но под действием цитохрома С показало, что изменение изучаемых параметров подвержено тем же закономерностям, что и под действием никотинамида. В то же время протективные свойства цитохрома С выражены еще более четко, чем у никотинамида. Для МП улитки различие в снижении амплитуды под действием одного антибиотика в дозе 100 мг/кг и антибиотика в той же дозе, введенного с цитохромом С, составляло на всех исследуемых частотах от 38 до 57 %.

При регистрации ПД слухового нерва в ответ на воздействие высокой интенсивности звукового стимула эффективность цитохрома С оказалась небольшой (от 5 до 26 %), однако при воздействии меньших интенсивностей щелчка различие в снижении амплитуды для животных исследуемых групп составило от 34 до 45 % при действии отрицательной фазы щелчка и от 44 до 62 % — положительной.

Применение цитохрома С у животных, получавших мономицин в дозе 250 мг/кг, также оказалось несколько более эффективным с точки зрения протективного действия, чем применение никотинамида. У четырех животных этой группы регистрировался четкий ответ улитки на всех частотах, за исключением 8000 Гц, на средних частотах амплитуда МП составляла от 125 до 175 мкВ. Величина пика N_1 при максимальной интенсивности щелчка находилась в пределах 250—260 мкВ, порог возникновения ответа составлял 56 дБ. У двух животных МП улитки отсутствовал при наличии слабого ответа слухового нерва (амплитуда пика N_1 соответствовала 125 мкВ).

Полученные данные свидетельствуют, что массивные дозы мономицина (250 мг/кг) оказывают резко выраженное угнетающее действие на биоэлектрическую активность улитки и слухового нерва, которое уже не может быть полностью предотвращено назначением веществ, корригирующих различные звенья в цепи тканевого дыхания. Это свидетельствует о необратимом процессе дегенерации рецепторного аппарата улитки, в основе которого лежат глубокие и разносторонние нарушения клеточного метаболизма.

Однако выявленные существенные протективные свойства никотинамида и цитохрома С при повреждении волосковых клеток, вызванном мономицином, указывают на немаловажное значение снижения активности дыхательных ферментов в патогенезе аминогликозидного ототоксикоза.

Выводы

1. У животных, которым вводили никотинамид и цитохром С, существенно увеличивалась амплитуда микрофонного и неврального компонентов суммарного ответа улитки по сравнению с животными, получавшими только антибиотик, что свидетельствует о выраженных протективных свойствах изучаемых фармакологических средств по отношению к ототоксическому действию мономицина.

2. Эффективность никотинамида и цитохрома С существенно зависит от дозы ототоксического антибиотика: протективные свойства применяемых веществ четко выражены для мономицина в дозе 100 мг/кг и слабо выражены — при дозе 250 мг/кг. Это указывает на разносторонние нарушения клеточного метаболизма в патогенезе аминогликозидного ототоксикоза при применении массивных доз антибиотика.

E. A. Bakay, L. B. Neschetnaya

A STUDY OF PROTECTIVE NICOTINAMIDE AND CYTOCHROME C PROPERTIES IN CASE OF AMINOGLYCOSIDE OTOTOXICOSIS

Summary

Nicotinamide and cytochrome C were studied for their effect on ototoxic properties of monomycin, an aminoglycoside antibiotic. The effectivity of the given drug was evaluated using cochlear microphonics and cochlear nerve action potential data after 10-day treatment. The administration of monomycin together with nicotinamide or cytochrome C demonstrated a significant protective effect of the two latter against monomycin toxic action on a peripheral part of the auditory analyser depending on the dose of the antibiotic.

Institute of Otolaryngology, Kiev

Список литературы

1. Гюльхасян А. А. Об ототоксическом действии некоторых антибиотиков, мерах его профилактики и лечения: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1971. — 21 с.
2. Лахно Ю. В., Чаговец Р. В., Шестопалова В. М. Влияние различных умов на утворення кодегідроз у тканинах. — В кн.: 6-й з'їзд Укр. фізіол. т-ва. Київ, 1961, с. 250.
3. Плужников М. С., Теплицкая Т. И. О кумуляции неомицина во внутреннем ухе. — Журн. ушн., нос. и горл. болезней, 1972, № 2, с. 21—25.
4. Попов Ю. В., Бакай Э. А., Кадук Б. Г. Система регистрации микрофонного ответа улитки и потенциала действия слухового нерва. — Там же, 1978, № 2, с. 108—109.
5. Романов В. А., Иванов Б. С. Состояние гемодинамики улитки при одновременном парентеральном введении стрептомицина и кокарбоксилазы. — Там же, с. 34—37.
6. Северин С. Е., Цейтлин Л. А. Ферментативное расщепление дифосфопиридиннуклеотида (ДПН) в гомогенатах сердечной мышцы в условиях экспериментального миокардита. — Вопр. мед. химии, 1964, 10, вып. 3, с. 300—305.
7. Хечинашвили С. Н., Кеванишвили З. Ш., Каджая О. А. и др. Объективное исследование слуха путем регистрации усредненных вызванных потенциалов. — Вестн. оториноларингологии, 1974, № 3, с. 30—36.
8. David J., Lim M. D. Ultrastructural cochlear changes following acoustic hyperstimulation and ototoxicity. — Ann. Otolaryngol., 1976, 85, N 6, p. 740—751.

9. Holz E., Stange Preliminary report N 4, p. 359—363.
10. Jankowski W., zatrociu kanamy Pol., 1968, 22, N 1.
11. Kaku G., Farme mistry. — Arch. C
12. Kaplan N. O., G mouse. — J. Viol.
13. Postma D. S., P glycogen due to
15. Saitō H., Daily J and kanamycin i

Киевский институт отоларингологии

9. Holz E., Stange G., Soda T., Beck C. Decrease of ototoxicity of streptomycin sulfate. Preliminary communication of animal experiments. — Arch. Otolaryngol., 1968, 87, N 4, p. 359—363.
10. Jankowski W., Ziemiński Z. Działanie «osłaniające» cytochromy C w miejscowym zatruciu kanamycyna lub streptomycyna narządu Cortiego zwierzęcia. — Otolaryngol. Pol., 1968, 22, N 44, p. 513—518.
11. Kaku G., Farmer J. C., Hadson W. R. Ototoxic drug effects on cochlear histochemistry. — Arch. Otolaryngol., 1973, 98, N 4, p. 278—282.
12. Kaplan N. O., Goldin A., Humphreys S. R. et al. Piridine nucleotide synthesis in the mouse. — J. Viol. Chem., 1956, 219, N 1, p. 287—298.
13. Postma D. S., Pecorak J. B., Prazma J. et al. Outer hair cell loss and alteration in glycogen due to tobramycin sulfate. — Arch. Otolaryngol., 1976, 102, N 3, p. 154—159.
15. Saitō H., Daily J. F. Quantitative analysis of acid mucopolysaccharides in the normal and kanamycin intoxicated cochlea. — Acta otolaryngol., 1971, 71, N 1, p. 22—26.

Киевский институт
отоларингологии

Поступила в редакцию
22.12.80