

Сравнение ототоксичности амикацина и нетромицина при их введении неполовозрелым животным

Ю.С.Ишанова¹, И.Н.Дьяконова², И.В.Рахманова¹, А.М.Тихомиров³

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, НИЛ клинической и экспериментальной детской оториноларингологии, Москва (зав. лабораторией — проф. И.В.Рахманова);

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра физиологии медико-биологического факультета, Москва (зав. кафедрой — проф. А.Г.Камкин);

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра физики и математики педиатрического факультета, Москва (и.о. зав. кафедрой — проф. А.Г.Максина)

Цель работы — сравнительный анализ ототоксичности амикацина и нетромицина при их введении неполовозрелым животным в терапевтических дозах. В результате, по данным регистрации вызванной отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения и записи коротколатентных стволомозговых вызванных потенциалов, выявлено более выраженное токсическое действие амикацина, что отразилось в более значительном повышении порогов I пика и большем снижении его амплитуды по сравнению с группой животных, получавших нетромицин. Введение амикацина и нетромицина в одинаковой степени оказало повреждающий эффект на область наружных волосковых клеток, ответственных за восприятие на частотах 2 и 4 кГц.

Ключевые слова: амикацин, нетромицин, неполовозрелые кролики, орган слуха, коротколатентные слуховые вызванные потенциалы, отоакустическая эмиссия на частоте продукта искажения

Comparison of Amikacin and Netromycin Ototoxicity when Administered to Immature Animals

Yu.S.Ishanova¹, I.N.Diakonova², I.V.Rakhmanova¹, A.M.Tikhomirov³

¹Pirogov Russian National Research Medical University, Research Laboratory of Clinical and Experimental Pediatric Otorhinolaryngology, Moscow (Head of the Laboratory — Prof. I.V.Rakhmanova);

²Pirogov Russian National Research Medical University, Medical-Biological Faculty, Department of Physiology, Moscow (Head of the Department — Prof. A.G.Kamkin);

³Pirogov Russian National Research Medical University, Pediatric Faculty, Department of Physics and Mathematics, Moscow (Acting Head of the Department — Prof. A.G.Maksina)

The aim of the research was the comparative analysis of ototoxicity of amikacin and netromycin after their introduction to immature animals in therapeutic doses. As a result according to the registration of distortion-product otoacoustic emission and the record of short-latency auditory brainstem response more expressed toxic action of amikacin was revealed which was reflected in more substantial increase of thresholds of the 1st peak and greater decrease of its amplitude in comparison with the group of the animals receiving netromycin. Introduction of amikacin and netromycin took the same damaging effect on the area of outer hair cells responsible for the perception of frequencies 2 and 4 kHz.

Key words: amikacin, netromycin, immature rabbits, the organ of hearing, auditory brainstem response, distortion-product otoacoustic emission

Для корреспонденции:

Ишанова Юлия Сергеевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник НИЛ клинической и экспериментальной детской оториноларингологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Телефон: (499) 236-4538

E-mail: ishanova@hotmail.com

Статья поступила 24.11.2014, принята к печати 24.12.2014

Для купирования неонатальных инфекций в качестве стартовой терапии часто используют антибиотики аминогликозидного ряда, обладающие потенциально ототоксическим действием [1]. Хотя дозирование всех лекарственных препаратов зависит от массы тела ребенка, гестационного возраста и ренальной функции, тем не менее использование этой группы препаратов занимает ведущее место среди причин нарушения слу-

ха у детей группы риска [2]. Из литературы известны факты, указывающие, что применение амикацина в дозах, рекомендованных в справочнике лекарств Neofax (2007), не сопровождается уменьшением амплитуды ответа отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (ПАОАЭ) у недоношенных детей (32–37 нед гестации) [3]. По мнению других исследователей, ототоксический эффект от амикацина может проявляться в виде уменьшения общей мощности ответа вызванной отоакустической эмиссии [3–5]. Экспериментальные данные свидетельствуют о повышении порогов коротколатентных слуховых вызванных потенциалов (КСВП) [6] и снижении амплитуды ответа ПАОАЭ на частотах от 2 до 6 кГц [7] после введения амикацина. Сведения о применении нетромицина в клинике также противоречивы. Экспериментально доказан ототоксический эффект терапевтических доз нетромицина на слуховой анализатор неполовозрелых животных [8].

Экспериментальные исследования, посвященные сравнительному изучению ототоксических проявлений амикацина и нетромицина на незрелый слуховой анализатор, отсутствуют.

В связи с этим в настоящей работе была поставлена цель сравнительной оценки влияния терапевтических доз амикацина и нетромицина на незрелый слуховой анализатор неполовозрелых животных по данным регистрации коротколатентных стволомозговых вызванных потенциалов и вызванной отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения.

Материалы и методы

Исследование проводили на 20 кроликах контрольной группы и 47 кроликах опытной группы, где 23 кролика (опытная подгруппа А) получали амикацин и 24 кролика — нетромицин (опытная подгруппа Б). Терапевтические дозы амикацина вводили из расчета 15 мг/кг в сутки, нетромицина — 5 мг/кг в сутки в течение 7 дней. Инъекции препаратов начинали с 12-го дня жизни после контрольной записи КСВП. В дальнейшем состояние органа слуха контролировали в 26, 35, 45 дней, в 2 и 3 мес жизни методами КСВП и ПАОАЭ.

Методики проведения записи КСВП и ПАОАЭ были стандартными и детально представлены в опубликованных ранее работах [8, 9].

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с применением программы «Statgraphics Centurion XV». Для каждого исследуемого признака определяли показатель среднего арифметического (M) и стандартной ошибки среднего арифметического (m). Нормальность распределения оценивали по значениям асимметрии и эксцесса. При условии соответствия нормальности распределения достоверность полученных различий сопоставляемых величин оценивали с использованием t -критерия Стьюдента, при непараметрической статистике — критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Исследования одобрены Этическим комитетом РНИМУ им. Н.И.Пирогова (протокол № 635 от 27.11.2010).

Результаты исследования и их обсуждение

Для представления об общем токсическом воздействии на растущий организм животного была проанализирована динамика массы тела кроликов контрольной и опытной групп за одинаковые периоды времени. Статистически достоверное снижение массы тела в 35, 45 дней и 2 мес жизни обнаружено у кроликов, получавших нетромицин (опытная подгруппа Б). У кроликов, получавших амикацин (опытная подгруппа А), в 35 дней и 2 мес жизни регистрировали достоверно более высокие показатели массы тела по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$). При взвешивании в 3 мес жизни достоверной разницы в показателях массы тела кроликов различных групп не обнаружено. Таким образом, нетромицин оказывает временный (обратимый) общетоксический эффект на растущий организм, проходящий к наступлению половозрелости. Введение амикацина, наоборот, сопровождается увеличением средней массы тела кроликов по сравнению с группой контроля.

Изучение пороговых величин появления I пика КСВП у животных контрольной и опытных групп в течение всего срока наблюдения показало, что введение терапевтических доз амикацина и нетромицина приводит к их повышению (рис. 1).

Как видно из рис. 1, в первые 14 дней после введения антибиотиков естественное возрастное снижение пороговых величин I пика в одинаковой степени замедлено у кроликов опытных подгрупп по сравнению с контрольной группой. Начиная же с 26-го дня жизни, реакция на введение препаратов различна. В опытной подгруппе Б введение нетромицина прекратило дальнейшее снижение величины порогов I пика, и они оставались достоверно повышенными ($p < 0,01$) в течение всего периода наблюдения. В опытной подгруппе А в течение 26 дней после окончания введения амикацина наблюдали замедленное по сравнению с нормой снижение порогов I пика (до 45-го дня жизни). Более выраженный повреждающий эффект амикацина проявился позднее, после 45-го дня жизни.

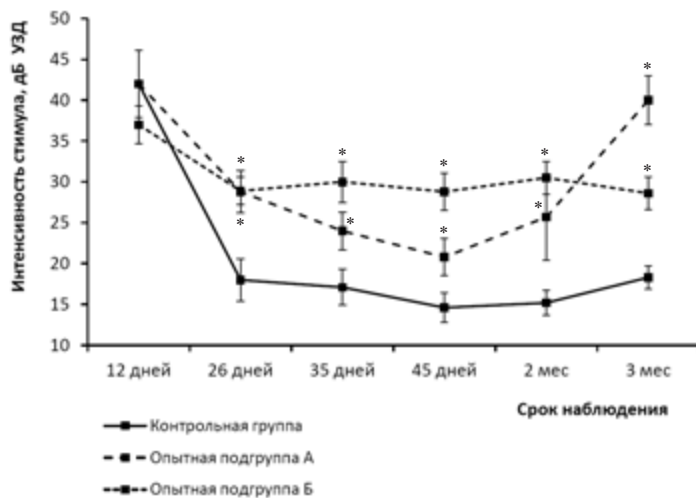


Рис. 1. Пороги появления I пика КСВП у животных контрольной и опытных групп в течение всего срока наблюдения ($M \pm m$). * — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы.

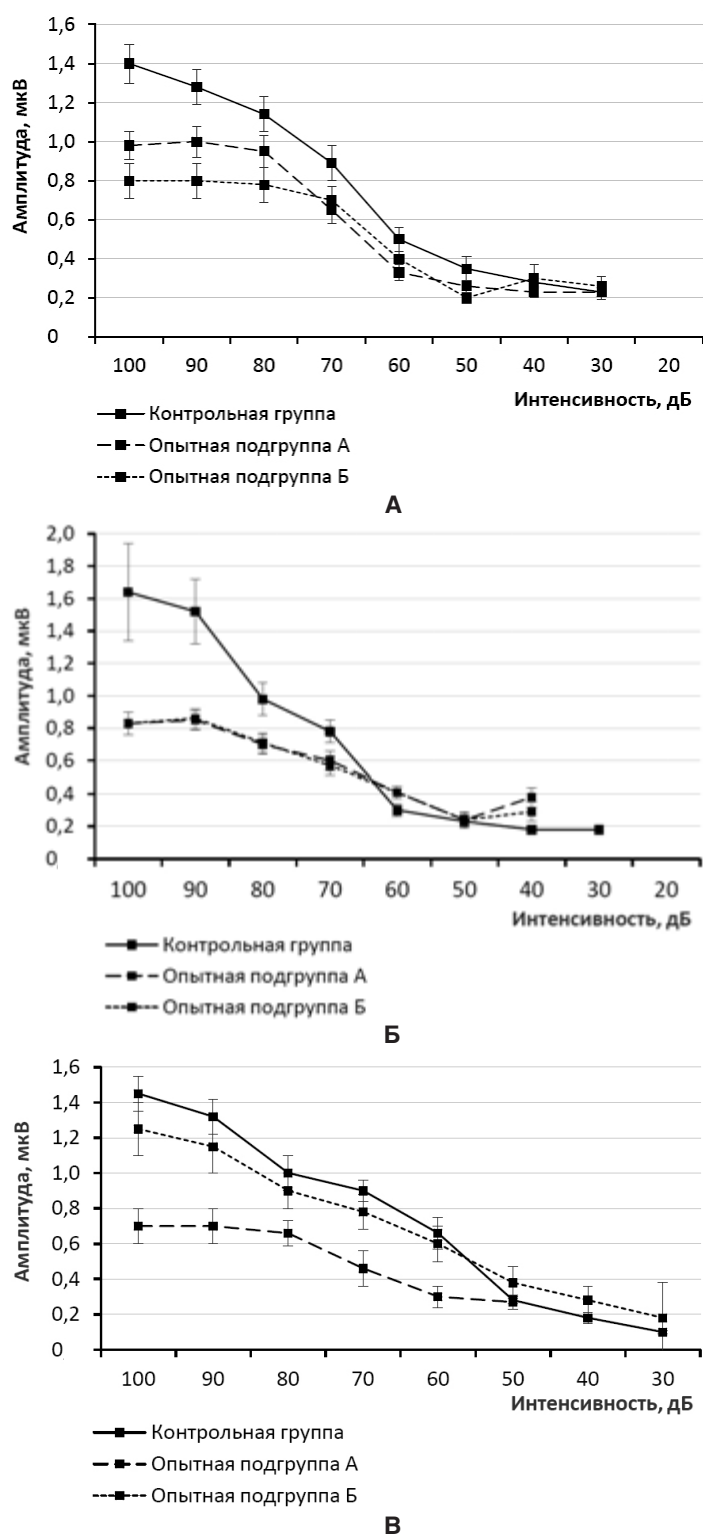


Рис. 2. Зависимость показателей амплитуды ответа I пика от интенсивности раздражителя в 26 дней (А), в 45 дней (Б) и в 3 мес (В) ($M \pm m$).

К окончанию наблюдения порог регистрации I пика у кроликов, получавших амикацин, составил $40,1 \pm 3,2$ дБ (опытная подгруппа А), получавших нетромицин — $28,6 \pm 2,1$ дБ (опытная подгруппа Б) ($p < 0,01$).

Таким образом, оба препарата оказывают ототоксическое действие. По данным регистрации КСВП, можно сделать заключение, что амикацин оказывает отсроченное и более выраженное ототоксическое воздействие на пери-

ферический отдел незрелого слухового анализатора кроликов по сравнению с нетромицином.

Построение графиков зависимости латентности I пика КСВП от интенсивности раздражителя показало, что характер аппроксимирующих кривых опытных подгрупп и контрольной группы однотипен. Однако для кроликов опытной подгруппы А было характерно увеличение латентных периодов в области низких интенсивностей и «укорочение» кривой по сравнению с контрольной группой и опытной подгруппой Б. Это дает основание предполагать, что применяемые дозы нетромицина не оказывают негативного влияния на функции латентность/интенсивность и существенным образом не нарушают механизм передачи возбуждения в рецепторно-нейрональном синапсе по сравнению с воздействиями на кроликов, получавших амикацин.

Изучение в динамике величин амплитуды I пика выявило ее снижение при введении амикацина и нетромицина. Как видно из рис. 2, у кроликов контрольной группы в течение всего срока наблюдения показатели амплитуды ответа существенно не изменялись. Для кроликов опытной подгруппы А было характерно снижение амплитуды ответа в области высоких интенсивностей (70–100 дБ) в 26, 45 дней и 3 мес жизни. Амплитуда I пика у кроликов подгруппы Б, получавших нетромицин, в 26, 45 дней жизни статистически не различалась, а в 3 мес была достоверно выше на интенсивностях 80–100 дБ по сравнению с животными, получавшими амикацин ($p < 0,001$).

Поскольку амплитуда I пика отражает активность нейронов спирального ганглия, то снижение его амплитуды в ответ на одинаковые звуковые стимулы в контрольной и опытных группах указывает на снижение количества синхронно возбужденных нейронов. Следовательно, можно предполагать повреждающее действие антибиотиков на нейроны спирального ганглия. При этом эффект повреждения в 26 дней (см. рис. 2, А) отмечен в большей степени в подгруппе Б, а в 45 дней (см. рис. 2, Б) — он одинаков. В 3 мес жизни (см. рис. 2, В) активность нейронов спирального ганглия достоверно снижена в подгруппе А, т.е. у животных, получавших амикацин. В этот срок амплитудные значения у кроликов, получавших нетромицин, статистически не отличны от группы контроля.

Таким образом, в течение периода наблюдения отмечено снижение амплитуды I пика после окончания введения препаратов. Ототоксическое влияние амикацина было более выраженным по сравнению с воздействием нетромицина.

При сравнительном изучении центрального времени проведения не было выявлено статистически значимого различия данных между опытными и контрольной группами. Таким образом, введение терапевтических доз нетромицина и амикацина в процессе созревания не оказало существенного влияния на созревание центральных структур слухового пути.

Поскольку принято считать, что аминогликозиды приводят прежде всего к повреждению наружных волосковых клеток (НВК) и в первую очередь базальной области кортиева органа [10], то необходимо было детально исследовать функционирование НВК [7]. Для этого использовали широко применяемый в клинике метод регистрации микромеханических колебаний (регистрация вызванной

Таблица. Результаты регистрации амплитуды ответа ПИОАЭ на разных частотах у кроликов контрольной и опытных групп, дБ ($M \pm m$)

Срок обследования	Тестируемая частота, кГц	Контрольная группа	Опытная подгруппа А (амикацин)	Опытная подгруппа Б (нетромицин)
26 дней	1	1,4 ± 1,6	4,0 ± 1,4	-1,5 ± 1,5*
	2	13,4 ± 1,4	15,2 ± 1,0*	11,0 ± 1,5
	4	35,0 ± 1,3	32,5 ± 0,6*	33 ± 0,5*
	6	33,2 ± 1,0	32,4 ± 1,0^	30,2 ± 0,8*
35 дней	1	6,4 ± 1,3	4,6 ± 1,3	4,7 ± 1,2
	2	17,4 ± 0,6	15,2 ± 0,7*^	17,8 ± 1,0
	4	34,3 ± 0,6	27,7 ± 0,9*^	32,0 ± 0,8*
	6	34,3 ± 0,8	33,1 ± 0,7	32,4 ± 1,2
45 дней	1	2,2 ± 1,4	6,0 ± 2,0	0,1 ± 1,3*
	2	18,4 ± 0,5	15,7 ± 0,9*	15,6 ± 1,2*
	4	34,3 ± 0,6	27,6 ± 0,9*^	30,7 ± 1,0*
	6	33,2 ± 0,7	35,3 ± 0,8*^	31,0 ± 1,5*
2 мес	1	2,6 ± 1,2	4,6 ± 1,2	7,6 ± 1,4
	2	19,0 ± 0,9	17,0 ± 0,6*	16,3 ± 0,9*
	4	33,0 ± 1,0	26,2 ± 0,8*^	30,4 ± 1,3*
	6	32,3 ± 1,0	30,7 ± 1,0*^	33,9 ± 0,8
3 мес	1	1,6 ± 1,1	6,4 ± 1,4	4,1 ± 1,8
	2	18,5 ± 0,9	11,3 ± 3,6*	13,2 ± 2,7*
	4	31,1 ± 0,5	28,1 ± 1,0*	27,1 ± 2,6*
	6	32,4 ± 0,9	31,6 ± 1,2	30,9 ± 1,9

* — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы;
 ^ — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем опытной подгруппы Б

отоакустической эмиссии, ВОАЭ), вызванных звуковым стимулом, позволяющий оценить эффективность работы НВК. Основной характеристикой используемого ответа отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения служит величина ее амплитуды.

Во всех случаях при записи ПИОАЭ был получен результат «Тест пройден», что в целом свидетельствовало о достаточной функциональной активности НВК после введения как амикацина, так и нетромицина.

Мощность ответа ПИОАЭ в группе контроля статистически достоверно возрастала между 26–35 днями жизни ($p < 0,05$), а затем уже не претерпевала статистически значимых изменений. Максимальный пик мощности у животных контрольной группы был зафиксирован в 35 дней. Показатель мощности ответа, зафиксированный в 26 дней жизни, уже соответствовал таковому у половозрелых животных (3 мес жизни) ($p > 0,05$). Сравнение полученных результатов мощности ответа ПИОАЭ у животных после введения препаратов выявило нестабильность результатов. Так, показатель мощности ответа улитки достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля у кроликов, получавших нетромицин, с 26-го по 45-й дни, у получавших амикацин — в 35 дней. Статистически достоверная разница между кроликами опытных подгрупп выявлена в срок 26 дней ($p < 0,05$). К возрасту половозрелости разности в показателях не выявлено.

Поскольку опытные и контрольная группы кроликов состояли из животных, у которых продолжался процесс созревания слухового анализатора, интересно было изучить влияние вводимых ототоксичных антибиотиков на скорость процесса созревания НВК. Показателем скорости формирования акустического ответа НВК может служить расчетный коэффициент прироста мощности ответа [11]. В группе контроля максимальный прирост мощности ответа

был зарегистрирован между 26-м и 35-м днями, что свидетельствовало о наибольшей скорости созревания именно в этот период времени. После 35-го дня жизни коэффициент прироста мощности ответа уже не был отличен от нуля для всех сроков наблюдения.

В опытной подгруппе А наибольшее значение коэффициента прироста наблюдали в более поздние сроки, а именно между 35-м и 45-м днями, а в опытной подгруппе Б еще позже, в интервале между 45-м днем и 2 мес жизни. Данные, полученные при сравнении коэффициентов прироста в контрольной и опытных группах, указывают на способность ототоксических антибиотиков задерживать формирование акустического ответа у животных с незрелым слуховым анализатором. При этом вводимые ототоксические антибиотики оказывают неодинаковое воздействие на скорость созревания НВК. Так, у кроликов, получавших нетромицин, коэффициент прироста мощности между 26-м и 35-м днями статистически не отличался от такового контрольной группы. У кроликов, получавших амикацин, коэффициенты нарастания мощности в интервале от 26-го до 45-го дня жизни были снижены по сравнению с контрольной группой. Максимальный прирост наблюдали в интервале между 35-м и 45-м днями.

Для выяснения повреждающих влияний амикацина и нетромицина на отдельные участки базиллярной мембраны, ответственные за определенную частоту улитки, на всех сроках обследования были проанализированы данные, полученные на каждой из тестируемых частот. При сравнении амплитуд ответа на тестируемых частотах (таблица) было получено достоверное стойкое снижение амплитуды ответа на частоте 4 кГц для кроликов опытных подгрупп, начиная с 26-го дня жизни. Стойкое снижение на частоте 2 кГц отмечено для кроликов, получавших амикацин, начиная с 35-го дня жизни, а для кроликов, получавших нетромицин, — с 45-го дня. При

сравнении полученной амплитуды ответа между кроликами, получавшими амикацин и нетромицин, достоверно ниже показатели были у кроликов подгруппы А на частоте 2 кГц в 35 дней жизни, на частоте 4 кГц — с 35-го дня по 2 мес жизни, на частоте 6 кГц — только в 2 мес жизни; для кроликов подгруппы Б — на частоте 6 кГц в 26 и 45 дней жизни.

Итак, в ходе наблюдения зафиксировано стойкое снижение амплитуды ответа на частотах 2 и 4 кГц для кроликов опытной группы в равной степени независимо от введенного препарата.

Заключение

Применение электрофизиологических методик для оценки функционирования различных отделов слухового анализатора позволило определить топику и сравнить степень повреждения после применения амикацина и нетромицина.

По данным КСВП, амикацин в период созревания слухового анализатора оказывает более выраженное ототоксическое воздействие на орган слуха по сравнению с нетромицином.

Введение амикацина и нетромицина не повлияло на возможность регистрации ответа ПИОАЭ, но оказало временный негативный эффект на мощность ответа улитки в целом. По данным ПИОАЭ, введение препаратов снижает работоспособность НВК, ответственных за восприятие частот 2 и 4 кГц в одинаковой степени, хотя зарегистрированные амплитуды достаточны и свидетельствуют о преобладании полезного сигнала над шумом, что позволяет зафиксировать ответ на данных интенсивностях. Данные ПИОАЭ в хроническом эксперименте показывают, что снижение амплитуды ответа происходит не сразу после окончания введения препаратов, а отсрочено. Данный эффект был более выражен у кроликов, получавших нетромицин.

Таким образом, высокие пороги детекции I пика КСВП и регистрация ПИОАЭ не исключают поражение не только клеток спирального ганглия, но и структур, участвующих в передаче импульса между внутренними волосковыми клетками (ВВК) и дендритами I нейрона без морфологических и функциональных изменений НВК и ВВК. Полученные результаты после введения амикацина и нетромицина согласуются с работой по изучению гентамицина, когда авторами было показано увеличение латентности I пика, уменьшение зарегистрированной амплитуды пиков КСВП без изменений НВК, ВВК, по данным флюоресцентной микроскопии [12, 13], что не исключает дальнейшую разработку данной темы с использованием методов гистологического исследования материала.

Полученные экспериментальные данные дают основание рекомендовать детям, получавшим в раннем неонатальном периоде ототоксические антибиотики (амикацин и нетромицин), дальнейший аудиологический контроль: неоднократное проведение вызванной отоакустической эмиссии и обязательное обследование слуховой функции с регистрацией слуховых вызванных потенциалов.

Литература

- Berardi A., Lugli L., Rossi C. et al. Neonatal bacterial meningitis // *Minerva Pediatr.* 2010. V.62 (3). Suppl.1. P.51–54.
- Van Dommelen P., Mohangoo A.D., Verkerk P.H. et al. Risk indicators for hearing loss in infants treated in different neonatal intensive care units // *Acta Paediatr.* 2010. V.99 (3). P.344–349.
- Ruggieri-Marone M., Schochat E. Distortion product otoacoustic emissions in newborns treated by ototoxic drugs // *Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord).* 2007. V.128 (1–2). P.41–46.
- Bielecki I., Horbulewicz A., Wolan T. Risk factors associated with hearing loss in infants: an analysis of 5282 referred neonates // *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011. V.75 (7). P.925–930.
- Naemi M., Maamouri G., Boskabadi H. et al. Assessment of aminoglycoside-induced hearing impairment in hospitalized neonates by TEOAE // *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009. V.61 (4). P.256–261.
- Bulut E., Yağiz R., Taş A. et al. Evaluation of the protective effect of magnesium on amikacin ototoxicity by electrophysiologic tests in guinea pigs // *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2005. V.15 (3–4). P.70–77.
- Aquino T.J., Oliveira J.A., Rossato M. Ototoxicity and otoprotection in the inner ear of guinea pigs using gentamicin and amikacin: ultrastructural and functional aspects // *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008. V.74 (6). P.843–852.
- Дьяконова И.Н., Рахманова И.В., Ишанова Ю.С. Влияние нетромицина на слуховой анализатор (экспериментальное исследование) // *Педиатр. фармакол.* 2011. №5 (8). С.70–75.
- Дьяконова И.Н., Рахманова И.В., Ишанова Ю.С. Влияние амикацина на созревание слухового анализатора у кроликов // *Бюл. экспер. биол. и мед. ЦАЭИ.* 2011. №5 (151). С.536–539.
- Jiang H., Sha S.H., Schacht J. NF-kappaB pathway protects cochlear hair cells from aminoglycoside-induced ototoxicity // *J Neurosci Res.* 2005. V.79 (5). P.644–651.
- Дьяконова И.Н., Рахманова И.В., Ишанова Ю.С. Формирование вызванного акустического ответа у недоношенных детей // *Вестн. РГМУ.* 2012. №1. С.61–65.
- Liu K., Jiang X., Shi C. et al. Cochlear inner hair cell ribbon synapse is the primary target of ototoxic aminoglycoside stimuli // *Mol Neurobiol.* 2013. V.48 (3). P.647–654.
- Okuda T., Sugahara K., Takemoto T. et al. Inhibition of caspases alleviates gentamicin-induced cochlear damage in guinea pigs // *Auris Nasus Larynx.* 2005. V.32 (1). P.33–37.

Информация об авторах:

Дьяконова Ирина Николаевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры физиологии медико-биологического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-8300
E-mail: i-dyak@mail.ru

Рахманова Ирина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая НИЛ клинической и экспериментальной детской оториноларингологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (499) 236-4538
E-mail: ishanova@hotmail.com

Тихомиров Андрей Михайлович, кандидат технических наук, ассистент кафедры физики и математики педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (499) 236-4538
E-mail: amtkhomirov@list.ru