И.Н. Дьяконова, Ю.С. Ишанова, И.В. Рахманова, Я.М. Сапожников, А.М. Тихомиров, Е.Г. Сергеева

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва

Влияние нетилмицина на слуховой анализатор (экспериментальное исследование)

Контактная информация:
Ишанова Юлия Сергеевна, аспирант кафедры оториноларингологии педиатрического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова д. 1, **тел.:** (495) 434-18-21, **e-mail:** ishanova@hotmail.com
Статья поступила: 22.03.2011 г., **принята к печати:** 05.09.2011 г.

Целью данной работы явилось исследование влияния нетилмицина на слуховой анализатор неполовозрелых животных (кроликов). В работе представлены результаты обследования 20 интактных животных группы контроля и 24 животных опытной группы, получавших нетилмицин в терапевтической дозировке, равной 5 мг/кг в сут в течение 7 дней, начиная с 12-го дня жизни. Слуховая функция оценивалась по данным регистрации коротколатентных стволовых вызванных потенциалов (КСВП) и отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (ПИОАЭ). В результате введения терапевтических доз нетилмицина выявлен ототоксический эффект, проявляющийся в повышении порогов регистрации первого пика КСВП и снижениии амплитуды средних значений ПИОАЭ в основном за счет снижения амплитуды на частотах 4 и 6 кГц. Одновременно в опытной группе выявлено снижение массы тела в течение всего периода наблюдения.
Ключевые слова: *неполовозрелые животные (кролик), нетилмицин, слуховой анализатор, волосковые клетки, коротколатентные стволовые вызванные потенциалы, отоакустическая эмиссия на частоте продукта искажения.*

Комплекс мероприятий, проводимых при лечении недоношенных детей в палатах интенсивной терапии, включает обязательное использование антибиотиков, многие из которых обладают ототоксичным действием. По данным литературы, у детей, прошедших палаты реанимации и получавших терапию ототоксическими препаратами, нарушения со стороны слуха достигают 41,3% [1]. Наиболее распространенными из ототоксических медикаментов, используемых сегодня в педиатрической практике, как в нашей стране, так и за рубежом, являются антибиотики аминогликозидного ряда: амикацин и Нетромицин (нетилмицин) [2]. Предыдущими нашими исследованиями на неполовозрелых кроликах было показано, что терапевтические дозы амикацина оказывают ототоксический эффект на периферический отдел слухового анализатора, функционально не затрагивая стволовые структуры [3].

I.N. D'yakonova, Y.S. Ishanova, I.V. Rakhmanova, J.M. Sapozhnikov, A.M. Tikhomirov, E.G. Sergeyeva

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Effect of netilmicin on the auditory analyzer (experimental study)

The aim of this work was to study the effect of netilmicin on the auditory analyzer of immature animals (rabbits). This paper presents the results of a survey of 20 intact animals and 24 control animals of the experimental group who received netilmicin in a therapeutic dosage equal to 5 mg/kg per day for 7 days starting from the 12th day of life. Auditory function was assessed according to the registration of short stem-evoked potentials (SSEP) and otoacoustic emission distortion product (OEDP). As a result of therapeutic doses of netilmicin the ototoxic effect has been reveales, which manifests itself in raising the registration threshold of the first peak amplitude of the SSEP and lower average OEDP mainly by reducing the amplitude at frequencies of 4 and 6 kHz. At the same time the experimental group showed a reduction in body weight during the observation period.
Key words: *immature animals (rabbit), netilmicin, auditory analyzer, the hair cells, Short-stem evoked potentials, otoacoustic emission distortion product.*

Сведения о нетилмицине противоречивы: наряду с констатацией выраженного ототоксического эффекта [4] существует и противоположное мнение [5]. B. Granati и соавт. представили информацию об отсутствии влияния этого антибиотика на несозревший слуховой анализатор новорожденных детей [6]. С другой стороны, при лечении этим препаратом недоношенных детей с разным сроком гестации, описан дозозависимый ототоксический эффект [7]. В связи с этим при назначении нетилмицина недоношенным детям рекомендуют рассчитывать дозу с учетом возраста гестации [8–11].

Цель исследования: изучить влияние терапевтических доз нетилмицина на слуховую функцию неполовозрелых кроликов в процессе созревания слухового анализатора.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование, а также содержание и все манипуляции на экспериментальных животных проведены в соответствии с требованиями Этического комитета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, разработанными на основе Хельсинской декларации.

Исследования проводились в двух группах неполовозрелых кроликов породы шиншилла: контрольной и опытной. У животных обеих групп еда и вода были в свободном доступе. Контрольную группу составили 20 интактных животных (40 ушей) разного пола в возрасте от 12 до 45 дней.

Опытную группу составили 24 животных (48 ушей), которым с 12-го дня жизни после контрольного обследования слуховой функции вводили подкожно по 5 мг/кг в сут раствор нетилмицина (Нетромицин, «Шеринг-Плау Сентрал Ист Аг», Бельгия) в течение 7 дней при ежедневном контроле массы тела. Суммарное количество введенного препарата соответствовало терапевтическим дозам, общепринятым в педиатрической практике.

Выбор начала сроков введения определялся следующими соображениями: наличием еще незавершенного процесса созревания слухового анализатора и уже устойчивой регистрацией слуховых вызванных ответов [3].

Спустя 7 дней после курса антибиотикотерапии проводили трехкратное обследование слуховой функции — в 26, 35 и 45 дней жизни. В эти же сроки проводили обследование контрольной группы. Необходимо отметить, что 4 опытных животных погибли на 31-й день жизни.

Объективную оценку слуховой функции проводили с помощью регистрации коротколатентных стволовых вызванных потенциалов (КСВП) и записи вызванной отоакустической эмиссии на частоте продукта искажения (ПИОАЭ).

Регистрацию КСВП в диапазоне от 0 до 100 дБ с шагом в 10 дБ осуществляли в центромастоидальном отведении с помощью подкожно введенных игольчатых электродов по методике, описанной ранее [11]. Интенсивность щелчка контролировалась шумомером и соответствовала указанным на приборе числам в пиковом импульсном значении. Проводили 600 усреднений, время анализа составляло 10 мс. Запись производили на приборе фирмы «Biomedica» (Италия) после внутримышечного введения 2%-го раствора рометара (Xyiazinum 20 мг в 1 мл, СПОФА, Чехия), обладающего миорелаксирующим и анальгезирующим действием. Как показано в исследовании T. Saito и соавт., применение подобных препаратов не влияет на регистрацию амплитудно-временных характеристик вызванных потенциалов мозга [12].

Регистрацию ПИОАЭ производили на приборе Eclipse фирмы «Interacoustics A/S» (Дания) на частотах продукта искажения, равных 0,638; 1,278; 2,556 и 3,836 кГц, в ответ на стимуляцию двумя тонами. Использовали тональные стимулы f_1 и f_2 ($f_1 < f_2$), $f_2/f_1 = 1{,}22$, анализировался разностный тон $2f_1 — f_2$. В данном исследовании f_2 было равным 1, 2, 4 или 6 кГц, а f_1, соответственно, 0,819; 1,639; 3,278 и 4,918 кГц. Уровень интенсивности стимуляции для L_1 равнялся 65 дБ, для L_2 — 55 дБ уровня звукового давления (УЗД).

Для получения результата «Тест пройден» было необходимо, чтобы разность между полезным сигналом и шумом (S/N) была не менее 7 дБ при толерантности стимула (максимально допустимое отклонение между реальным и заданным уровнем стимуляции) не более 3 дБ. Тест в целом считался пройденным, когда регистрировался показатель S/N > +7 дБ на 3 из 4 предъявляемых частотах.

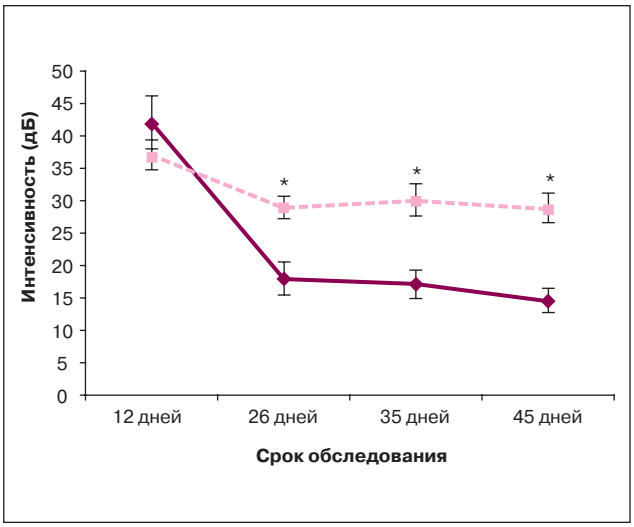
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходная масса тела у кроликов контрольной группы была достоверно ниже, чем в опытной ($p < 0{,}05$) (табл. 1). Это связано с тем, что для опытов были отобраны более крупные животные. Однако уже с 26-го дня масса кроликов опытной группы достоверно снижалась ($p < 0{,}05$), что может свидетельствовать об остром общем токсическом резорбтивном действии применяемых терапевтических доз нетилмицина на растущий организм животного. Поскольку масса опытных животных достоверно отличалась в течение всего срока наблюдения (45 дней), то следует считать данный временной период исследования периодом острой интоксикации.

Таблица 1. Масса тела кроликов (г) контрольной и опытной групп за период наблюдения (M ± m)

Дни обследования	Контрольная группа	Опытная группа	*p*
12	230 ± 12	260 ± 17	< 0,05
26	464 ± 24	430 ± 14	< 0,05
35	790 ± 22	700 ± 27	< 0,05
45	1133 ± 28	1005 ± 22	< 0,05

Рис. 1. Пороги появления I пика КСВП (дБ) у животных контрольной (сплошная линия) и опытной групп (прерывистая линия) (M ± m)

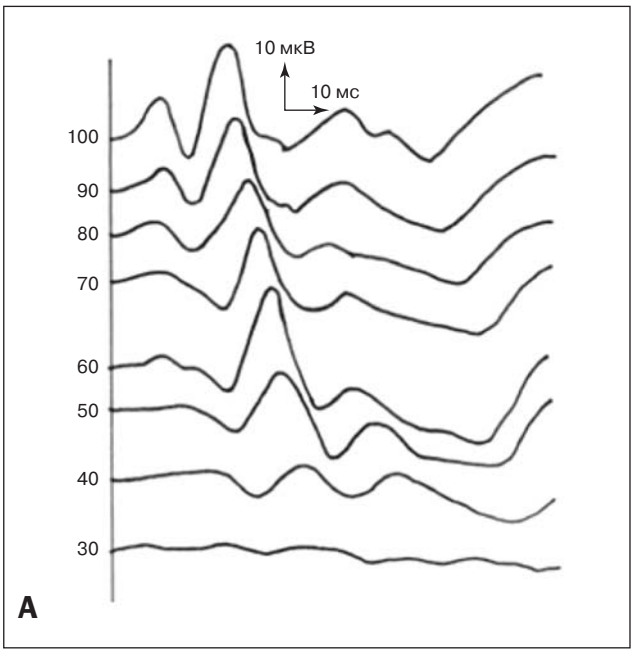


Примечание. Здесь и на рис. 5, 6: * — $p < 0,05$.
КСВП — коротколатентные стволовые вызванные потенциалы.

Введение животным нетилмицина сопровождалось статистически достоверным ($p < 0,05$) повышением пороговых величин воспроизведения пиков КСВП по сравнению с контрольной группой. При этом в контрольной группе по мере роста животного происходило снижение порогов воспроизведения пиков (рис. 1), что свидетельствовало о созревании слухового анализатора. В опытной группе пороговые величины после 26-го дня жизни остались практически без изменений. Одновременно с отсутствием снижения пороговых величин отмечалось уменьшение амплитуды пиков во всем диапазоне предъявляемых интенсивностей, что можно видеть на кривых, зарегистрированных до и после проведенного курса антибиотиком (рис. 2 А, Б; 3 А, Б). Снижение амплитуды пиков КСВП свидетельствовало об уменьшении количества одновременно возбужденных нейронов и, прежде всего, нейроцитов спирального ганглия, ответственных за амплитуду первого пика. Уменьшение количества возбужденных нейронов спирального ганглия может быть связано как с повреждением самих клеточных элементов ганглия, так и с повреждением рецепторного аппарата улитки. Картина деструктивного процесса нейроцитов спирального ганглия в различные сроки после введения ототоксических антибиотиков неполовозрелым животным довольно подробно уже изучалась в нашей лаборатории [13, 14], при этом ототоксическое действие антибиотика проявлялось не только в повреждающем эффекте нейроцитов спирального ганглия, но и в нарушении созревания периферических нейрональных структур. В данном случае нельзя исключить поражения внутренних волосковых клеток. В работе J. Wang и соавт. [15] показано, что даже значительная потеря внутренних волосковых клеток, как и клеток спирального ганглия, не изменяет функциональные характеристики оставшихся нейросенсорных элементов, но снижает амплитуду составного потенциала действия слухового нерва.

Для анализа выявленных изменений полученные временные характеристики латентного периода первого пика КСВП были усреднены, статистически обработаны и представлены в виде графиков. На рис. 4 (А, Б, В) продемонстрированы зависимости латентного периода первого пика (ЛП1) от интенсивности раздражителя у интактных (1) и опытных (2) животных после проведения курса нетилмицина — в 26, 35 и 45 дней жизни.

Рис. 2. КСВП кроликов контрольной группы в 12 (А) и 45 дней (Б)



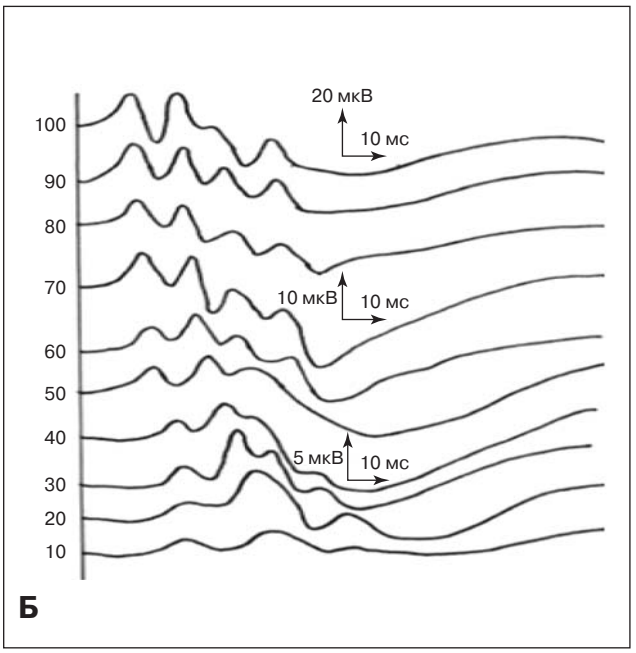
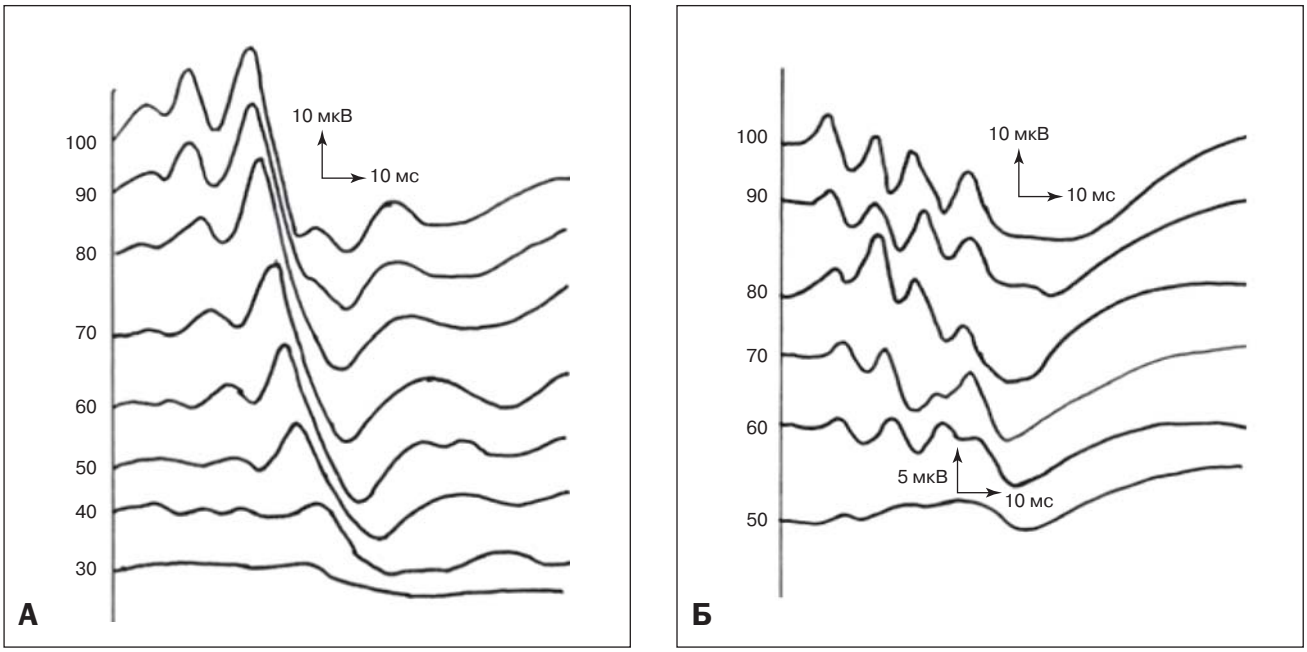


Рис. 3. КСВП кроликов опытной группы в 12 (А) и 45 дней (Б)



Во всех случаях кривые имели вид параболы, которая аппроксимируется полиномом второго порядка:

$$ЛП_1 = a + bI + cI^2,$$

где a, b, c — коэффициенты, описывающие кривую, а I — интенсивность стимула. Коэффициенты аппроксимирующей параболы приведены в табл. 2.

Как видно из рис. 4 А, в течение первых двух недель после введения антибиотика латентные периоды первого пика укорачиваются, что отражается на сдвиге всей кривой вниз по отношению к кривой группы контроля. Через четыре недели после окончания введения нетилмицина аппроксимирующие кривые, полученные от опытных и контрольных групп, практически совпадают. Следовательно, функциональные характеристики сохранившихся нейросенсорных элементов практически не изменились. Существенные различия заключаются в том, что экспериментальные точки для построения опытной (2) кривой заканчиваются в области 30–40 дБ, а точки для построения контрольной кривой (1) находятся в области 10 дБ (см. рис. 4 В). Эти факты дают основание думать, что нетилмицин затрагивает восприятие звука только в области низкой интенсивности, когда необходима активная работа наружных волосковых клеток. Иными словами, по-видимому, страдает активный механизм «раскачивания» покровной мембраны, который необходим для нормального звуковосприятия при уровне сигнала ниже 40–50 дБ.

Изучение центрального времени проведения, то есть времени прохождения нервного импульса по стволовым структурам мозга, после введения нетилмицина не выявило достоверных различий до и после приема антибиотика (табл. 3). Это позволяет предполагать, что используемые терапевтические дозы нетилмицина не оказывали существенного влияния на центральные структуры слухового пути.

Для проверки предположения о локализации повреждения на уровне наружных волосковых клеток всем животным была произведена регистрация ПИОАЭ, поскольку именно этот метод позволяет оценить жизнеспособность наружных волосковых клеток отдельных участков улитки

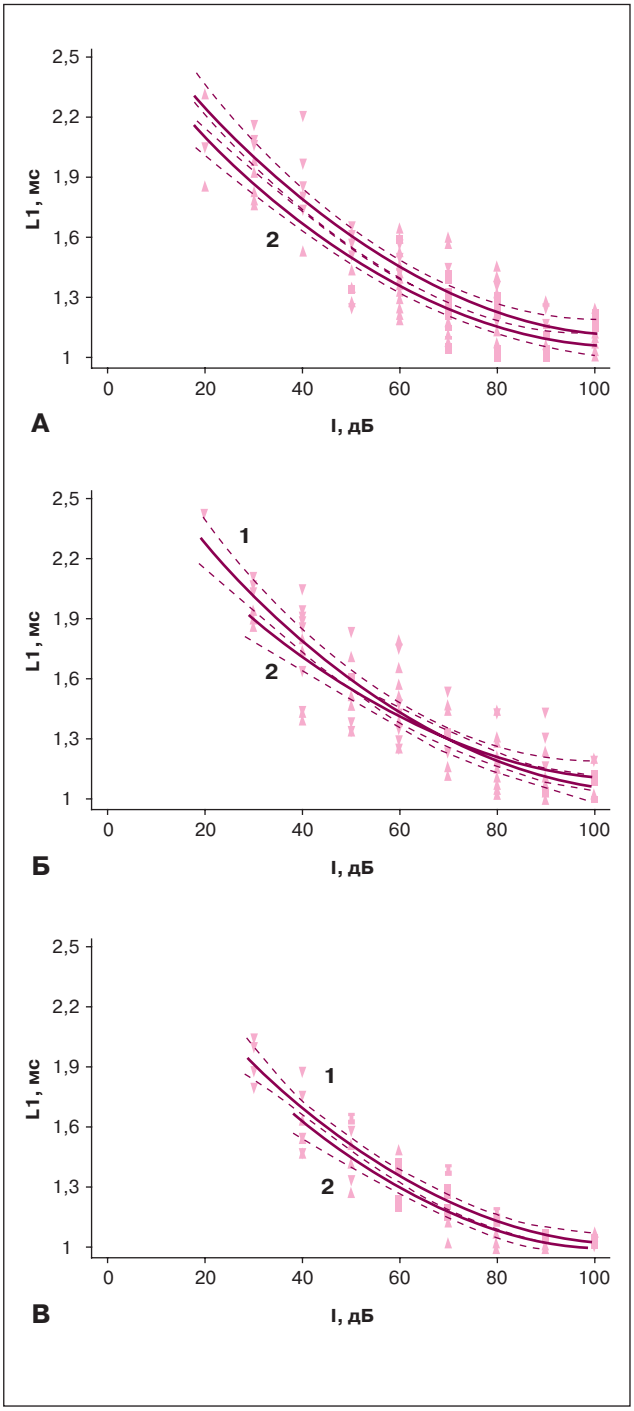
Таблица 2. Значения коэффициентов аппроксимирующей кривой в разные сроки наблюдения в контроле (1) и при введении нетилмицина (2)

Срок наблюдения, дней	Группа	A, мс	b, мс/дБ	c, мс/дБ^2	Критерий согласия R^2
26	1	2,78	-0,0313	0,000147	0,875
	2	2,63	-0,0272	0,000116	0,748
35	1	2,90	-0,0344	0,000164	0,841
	2	2,61	-0,0294	0,000138	0,804
45	1	2,77	-0,0325	0,000152	0,925
	2	2,67	-0,0317	0,000149	0,679

Таблица 3. Время проведения возбуждения от II до IV пика ($ЛП_{2-4}$ в мс) при интенсивности раздражителя 60дБ (M ± m)

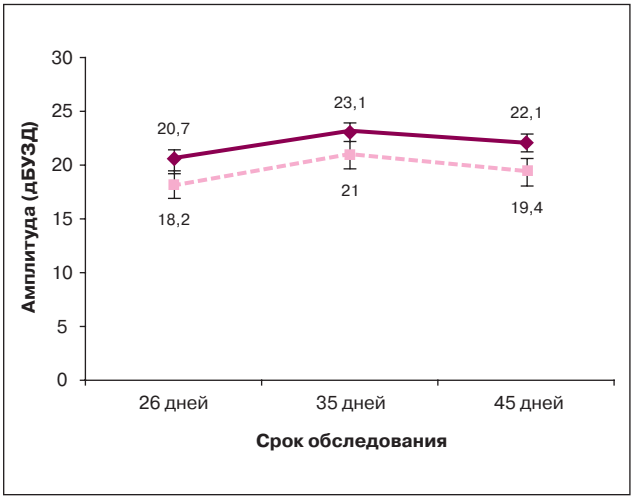
Дни обследования	Контрольная группа	Опытная группа	*p*
26	1,86 ± 0,10	1,88 ± 0,06	> 0,05
35	1,75 ± 0,19	1,82 ± 0,07	> 0,05
45	1,74 ± 0,22	1,67 ± 0,04	> 0,05

Рис. 4. Зависимости латентного периода первого пика ($ЛП_1$) КСВП от интенсивности раздражителя у интактных животных (1) и после проведения курса нетилмицина (2)



Примечание. А — 26 дней; Б — 35 дней; В — 45 дней. Сплошными линиями обозначена полиномиальная аппроксимация; штриховыми — область, соответствующая 95% уровню достоверности.

Рис. 5. Усредненные показатели амплитуд ответов ПИОАЭ у кроликов контрольной (сплошная линия) и опытной групп (прерывистая линия) (M ± m)



Примечание. Здесь и на рис. 6: ПИОАЭ — отоакустическая эмиссия на частоте продукта искажения.

и выявить частотно-специфический характер поражения улитки. Данный метод широко применяется для оценки ототоксического эффекта как в клинике, так и в эксперименте [16–18].

Провести регистрацию ПИОАЭ у кроликов в 12 дней жизни не удалось, поскольку размер стандартного неонатального вкладыша, который прилагается в комплекте к прибору для регистрации вызванной отоакустической эмиссии, оказался больших размеров, чем слуховой проход кролика. В связи с этим контрольная кривая при постановке зонда регистрировалась как неудовлетворительная. Обследование осуществлялось на 26-й день жизни.

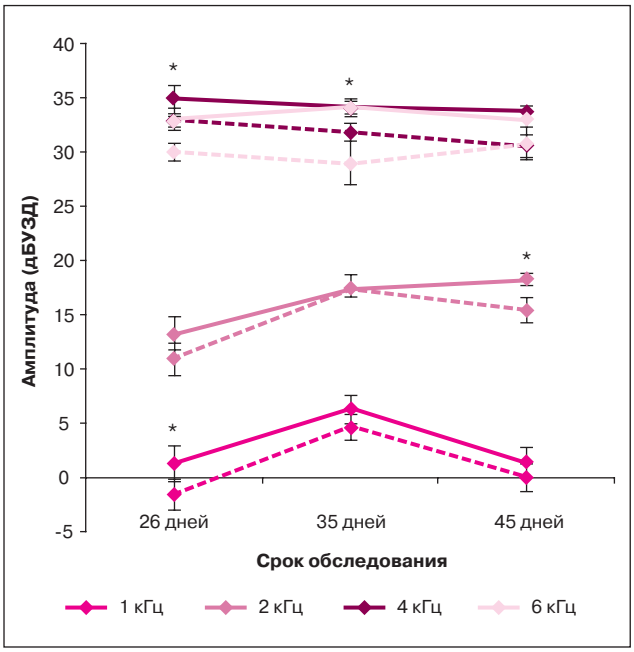
Всего было обследовано 17 кроликов (34 уха) группы контроля и 10 кроликов (20 ушей) из опытной группы. В результате проведения ПИОАЭ результат «Тест пройден» зарегистрирован от ушей всех кроликов обеих групп. Расчет значений усредненной амплитуды ответа показал достоверно высокие результаты в контрольной группе по сравнению с опытной в течение всех 45 дней наблюдений ($p < 0,05$) (рис. 5), что дает основание подтвердить предположение о негативном влиянии нетилмицина на работу наружных волосковых клеток. Дальнейший частотный анализ DP-грамм выявил, что в наибольшей степени, вероятно, страдают наружные волосковые клетки, необходимые для восприятия низкой интенсивности на частоте 4 и 6 кГц, поскольку именно на этих частотах наблюдалось наибольшее снижение амплитуд вызванных ответов (рис. 6).

ВЫВОДЫ

1. Введение терапевтических доз нетилмицина неполовозрелым животным оказывает общетоксическое воздействие, проявляющееся в снижении массы тела по сравнению с контрольными животными.
2. В острый интоксикационный период нетилмицин приводит к нарушению слуховой функции, что проявляется повышением порогов регистрации первого пика КСВП и снижением средних показателей амплитуд ответов ПИОАЭ.
3. Нарушение слуховой функции в большей степени выявлено на частоте 4 и 6 кГц, по данным регистрации ПИОАЭ.
4. Снижение амплитуды регистрируемых пиков КСВП не позволяет исключить возможность поражения клеток спирального ганглия или внутренних волосковых клеток.

На основании полученных данных следует рекомендовать всем детям, получавшим Нетромицин в раннем неонатальном периоде, консультацию оториноларинголога для контроля за состоянием слуховой функции в течение последующих двух месяцев с обязательным проведением объективной оценки слуха.

Рис. 6. Показатели амплитуды ПИОАЭ на тестируемых частотах у кроликов контрольной (сплошная линия) и опытной групп (прерывистая линия) в различные сроки обследования (M ± m)



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sun J.H., Li J., Huang P. et al. Early detection of hearing impairment in high-risk infants of NICU // Chin. J. Pediatr. — 2003; 41 (5): 357–359.
2. Дементьева Г.М., Кушнарева М.В. Фролова М.И. и др. Нетилмицин в комплексной терапии пневмонии у новорожденных // Антибиотики и химиотерапия. — 2001; 46 (4): 22–25.
3. Дьяконова И.Н., Рахманова И.В., Тихомиров А.М. и др. Влияние амикацина на созревание слухового анализатора у кроликов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2011; 151 (5): 536–540.
4. Marlow E.S., Hunt L.P., Marlow N. Sensorineural hearing loss and prematurity // Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed. — 2000; 82 (2): 141–144.
5. Klingenberg C., Smabrekke L., Lier T. et al. Validation of a simplified netilmicin dosage regimen in infants // Scand. J. Infect. Dis. — 2004; 36 (6–7): 474–479.
6. Granati B., Assael B.M., Chung M. et al. Clinical pharmacology of netilmicin in preterm and term newborn infants // J. Pediatr. — 1985; 106 (4): 664–669.
7. Auriti C., Rava L., Di Ciommo V. et al. Short antibiotic prophylaxis for bacterial infections in a neonatal intensive care unit: a randomized controlled trial // Hospital Infection Society. — 2005; 59 (4): 292–298.
8. Piekarczyk A., Kaminska E., Taljanski W. et al. Pharmacokinetics of netilmicin in neonates // Medycyna Wieku Rozwojowego. — 2003; 7 (4 Pt. 2): 547–555.
9. Kuhn R.J., Nahata M.C., Powell D.A. et al. Pharmacokinetics of netilmicin in premature infants // Eur. J. Clin. Pharmacology. — 1986; 29 (5): 635–637.
10. Rengelshausen J., Beedgen B., Tsamouranis K. et al. Pharmacokinetics of a netilmicin loading dose on the first postnatal day in preterm neonates with very low gestational age // Eur. J. Clin. Pharmacology. — 2006; 62 (9): 773–777.
11. Тихомиров А.М., Богомильский М.Р., Дьяконова И.Н. Метод объективной оценки слуховой функции по данным коротколатентных слуховых вызванных потенциалов // Вестник оториноларинг. — 1994; 3: 8–10.
12. Saito T., Yamamoto I., Huang X.L. et al. Effects of muscle relaxants on EEG, ABR and EMG in rabbits // Human Experimen. Toxicol. — 1999; 18 (12): 718–723.
13. Рахманова И.В., Дьяконова И.Н., Ярыгин В.Н., Древаль А.А. Морфофункциональная характеристика спирального ганглия кошки в условиях нейросенсорной тугоухости // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 1993; 5: 550–552.
14. Богомильский М.Р., Дьяконова И.Н., Рахманова И.В. и др. Особенности ототоксического действия мономицина на неполовозрелых животных // Вестник оториноларинг. — 2009; 5: 26–29.
15. Wang J., Powers N.L., Hofstetter P. et al. Effects of selective inner hair cell loss on auditory nerve fiber threshold, tuning and spontaneous and driven discharge rate // Hear Res. — 1997; 107 (1–2): 67–82.
16. Ali M.Z., Goetz M.B. A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of single daily dosing versus multiple daily dosing of aminoglycosides // Clin. Infect. Dis. — 1997; 24 (5): 796–809.
17. Ress B.D., Sridhar K.S., Balkany T.J. et al. Effects of cis-platinum chemotherapy on otoacoustic emissions: the development of an objective screening protocol. Third place-Resident Clinical Science Award 1998 // Otolaryngol. Head. Neck. Surg. — 1999; 121 (6): 693–701.
18. Gouveris H.T., Victor A., Mann W.J. Cochlear origin of early hearing loss in vestibular schwannoma // Laryngoscope. — 2007; 117 (4): 680–683.