维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)02-0185-03

治疗剂量阿米卡星在新生豚鼠药代动力学及耳毒性研究

许红梅 , 王绍映

(重庆医科大学儿科学院感染消化科,重庆 400014)

【摘 要】目的:明确新生豚鼠对氨基糖甙类抗生素耳毒性有无更高敏感性。方法:以扫描电镜及光镜观察人类等效治疗剂量下阿米卡星(AMK)对 36 只新生及成年豚鼠耳蜗毛细胞的影响,并用 TDx 检测新生及成年组豚鼠血浆 AMK 药代动力学。结果:(1)药代动力学:新生及成年豚鼠组均为二室开放性模型,峰浓度及达蜂时间无显著性差异,但新生组豚鼠清除率较成年组明显降低(分别为 0.0044±0.0011 和 0.0088±0.0014L/min.kg,$P<0.01$),消除半衰期明显延长(分别为 70.89±13.38 和 43.24±8.03min,$P<0.01$),曲线下面积明显增大(分别为 11461.5±4317.2 和 8165.9±3212.5,$P<0.01$)。(2)耳蜗毛细胞形态学:新生组豚鼠损伤出现早且严重;停药后毛细胞缺失数继续增多。结论:AMK 对新生、成年豚鼠耳蜗均有不同程度损害,并随用药时间延长而加重。新生豚鼠的敏感性高可能与该药从体内排出慢、易蓄积有关。

【关键词】阿米卡星;新生豚鼠;药代动力学;耳毒性

【中国图书分类法分类号】R944 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-12-27

Experimental study on the pharmacokinetics and ototoxicity of amikacin with therapeutic doses in neonatal guinea pig

XU Hongmei , et al

(*Department of Infectious and Digestive Diseases , College of Pediatrics , Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clarify the possibility of higher sensitivity to ototoxicity of aminoglycosides in neonatal animal. *Methods*: The difference in ototoxicity was studied by scanning electron-microscopy and microscopy between neonatal and adult groups of 36 guinea pigs administrated with therapeutic doses of amikacin. Pharmacokinetics was investigated in 10 guinea pigs in each group by TDx system. *Results*: (1)The pharmacokinetics were compatible with the model of two compartment in all age groups. There was no significant difference in the peak level and peak time. Compared with adult group, the plasma clearance was lower(0.0044±0.0011 and 0.0088±0.0014 L/min. kg, $P<0.01$), the half-life for elimination longer in neonatal group(70.89±13.38 和 43.24±8.03min, $P<0.01$), and AUC was larger(11461.5±4317.2 和 8165.9±3212.5, $P<0.01$). (2)On histological study for cochlea, the damage was more severe in neonatal groups than that in adults. The severity of cochlea damage was getting worse with a prolonged course of the administration. Continuous damage was observed after the drug had been stopped. *Conclusion*: The study shows that there is significant ototoxicity of AMK to cochlea in neonatal guinea pigs even with therapeutic doses equal to that in clinical use. The higher sensitivity to ototoxicity of AMK in neonatal animal is related to their much slow clearance and high possibility of accumulation for AMK.

【Key words】Amikacin; Guinea pig; Pharmacokinetics; Ototoxicity

氨基糖甙类抗生素耳毒性已成为目前我国儿童听力语言残疾的主要因素。然而有关新生儿在临床治疗剂量下该类药物所致耳聋的潜在危险性报道很少。本课题以人类耳蜗发育类似的豚鼠为对象,研究等效人类治疗剂量阿米卡星(AMK)对新生豚鼠的药代动力学与耳蜗基底膜毛细胞形态学改变的关系,为深入探讨新生儿合理使用该类药物提供理论依据。

作者介绍:许红梅(1965-),女,副教授,博士,主要研究方向:儿童期抗生素的副作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

耳蜗反射阳性、无中耳炎及外耳道炎的健康杂毛豚鼠(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄各半。新生豚鼠(孕龄 65~70 天足月出生的豚鼠)、成年豚鼠(出生后 5 月,体重 500~600g)。

1.2 AMK

维普资讯 http://www.cqvip.com

苏州第六制药厂生产,豚鼠剂量按人(15mg/(kg.d))与动物等效剂量折算公式[1]计算为 65mg/(kg.d)。

1.3 试剂

AMK 荧光偏振免疫测定试剂盒(南京军区南京总医院临床药理研究室提供)。

1.4 药代动力学

新生组、成年组豚鼠各 10 只,大腿内侧肌肉单剂注射 AMK 65mg/kg,给药后 5、10、20、30、40、60、120、180、240min 经耳缘静脉各取血 0.5ml。使用稀释缓冲液稀释 AMK 标准品,配制 0μg/ml、3.0μg/ml、10.0μg/ml、20.0μg/ml、35.0μg/ml、50.0μg/ml 浓度作标准曲线,再测样本的 AMK 浓度,3P87 程序求出每组各个动物药代动力学参数。

1.5 耳蜗基底膜毛细胞形态学

(1)分组:实验组:新生组、成年组豚鼠各 36 只,每日上午 9 时给药×14 天;对照组:同期饲养未给予任何处理的豚鼠各 6 只。(2)耳蜗标本收集时间:新生组、成年组:第 3、5 天给药次日各组处死 1 只,取一侧耳蜗作扫描电镜标本,第 7、10、14 天给药次日及第 28 天分别处死 9 只豚鼠作光镜标本;对照组:各组同期饲养 6 只豚鼠 28 天并处死作光镜检查。(3)光镜标本制备及观察:采用全内耳硝酸银染色法[2]制备标本及改良 Stockwell[3]法计算耳蜗基底膜毛细胞缺失总数。(4)扫描电镜标本制备:断头处死豚鼠,2min 内用 4% 戊二醛灌注固定耳蜗,0.1mol 磷酸缓冲液漂洗,锇酸固定、乙醇脱水、叔丁醇干燥、喷金并观察。

1.6 统计学分析

采用 SPSS10.0 for windows 统计分析软件进行运算,组间均数进行 t 检验。

2 结 果

2.1 一般观察

所有动物精神食欲正常,实验期间体重增加;无站立不稳、毛发竖立或脱落等异常现象,无死亡发生。

2.2 药代动力学

血药浓度-时间曲线见图 1,AMK 在各组体内

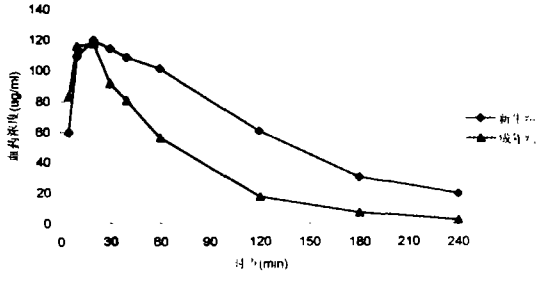


图 1 不同年龄组血药浓度-时间曲线



图 2 新生组在给药第 3 天出现基底膜底圈三排毛细胞听毛部分脱落(×200)



图 3 新生组第 5 天出现毛细胞缺失(×1200)



图 4 成年组第 3 天正常(×1600)



图 5 成年组第 5 天才出现轻度听毛改变(×2000)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同年龄组药物动力学主要指标($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	t_{pk}(达峰时间)(min)	C_{max}(峰浓度)(μg/ml)	CL(清除率)(L/min. kg)	$T_{1/2}$(清除半衰期)(min)	AUC_{0-t}(曲线下面积)
新生组	10	18.03±6.35	117.24±33.57	0.0044±0.0011	72.89±12.19	12116.5±4465.1
成年组	10	13.45±3.55	122.57±20.03	0.0088±0.0014	42.35±8.46	8405.6±3112.3
P(t)		>0.05(1.152)	>0.05(1.058)	<0.01(3.363)	<0.01(2.926)	<0.01(2.659)

表 2 光镜下(400×)不同时间各组毛细胞缺失数($\bar{x} \pm s$)

分组	第 7 天($n=9$)	第 10 天($n=9$)	第 14 天($n=9$)	第 28 天($n=9$)	对照组($n=6$)	P
新生组	13.57±5.21**	17.29±8.15**	28.50±10.55**	55.63±15.69**	0.17±0.41	35.268
成年组	2.57±3.62	5.43±2.68*	6.29±2.98**	13.63±5.22**	0.43±0.79	32.156
P(t)	<0.01(3.943)	<0.01(3.802)	<0.01(3.237)	<0.01(2.921)	>0.05(0.565)	

与对照组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$

均为二室开放性模型。药代动力学参数比较显示(表 1)：各组 C_{max} 及 t_{pk} 无显著性差异($P>0.05$)；新生组与成年组比较，其 $t_{1/2}$ 显著延长($P<0.01$)，CL 显著降低($P<0.01$)，AUC_{0-t} 明显增大($P<0.01$)；说明 AMK 从新生组体内清除较成年组显著为慢。

2.3 耳蜗毛细胞形态学

2.3.1 光镜结果(表 2) 各年龄组豚鼠毛细胞缺失程度均随给药次数增加而逐渐加重，与对照组比较显示新生组豚鼠于第 7 天已出现明显细胞缺失($P<0.01$)，而成年组于第 10 天才有明显变化($P<0.05$)；虽然实验组于第 14 天均已停药，但实验第 28 天毛细胞缺失数进一步较第 14 天显著增高(均 $P<0.01$)。说明新生组损伤出现早，且停药后毛细胞损伤过程仍在继续。同时间组间比较显示新生组较成年组毛细胞缺失数多，说明新生组毛细胞缺失程度较重。

2.3.2 电镜结果 新生组在给药第 3 天已出现基底膜底圈毛细胞听毛改变(图 2)，第 5 天出现毛细胞缺失(图 3)；而成年组第 3 天正常(图 4)，第 5 天才出现轻度听毛改变(图 5)。

3 讨 论

氨基糖甙类抗牛素在新生儿使用及其剂量一直存在不同意见。本课题在排除病理因素情况下、以耳蜗发育类似人类的哺乳动物——豚鼠[4]为研究对象，系统地研究等效人类治疗剂量 AMK 在新生豚鼠的药代动力学、耳蜗听觉感受细胞——毛细胞形态学变化，并探讨其关系，为临床正确用药提供实验依据。

药代动力学研究结果表明：AMK 从新生豚鼠体内排出的速度较成年豚鼠缓慢。这与 AMK 在哺乳动物体内极少降解、药物几乎全以原形从肾脏滤过排出，而新生豚鼠肾脏功能发育不完善、滤过率低下有关[5]，另外还可能与药物在体内进行性蓄积后导致肾脏损害、使肾小球滤过率进一步降低有关。

耳蜗毛细胞形态学研究显示：等效人类治疗剂量的 AMK，对新生、成年豚鼠耳蜗毛细胞均有不同程度的损害，但以新生豚鼠损害较重。据 Dolgova 等[6]报道内耳淋巴液中氨基糖甙类抗生素浓度与血中浓度密切相关，因而不难理解本实验中新生、成年豚鼠体内药代动力学特征的差异是 AMK 在新生组更易引起耳蜗损伤的重要原因。

本实验还显示即使停药后各组毛细胞损伤现象仍继续发展，这与许多患者在停用氨基糖甙类药物后数周甚至数月才出现明显听力下降或停药后听力损害会继续加重现象一致[7]。据认为可能与药物从内耳淋巴液排除缓慢有关，有实验证明一次给药后，内耳淋巴液内该类药物的清除半衰期为血的 5～6 倍[8]，连续给药则引起药物在内耳淋巴液内蓄积，从而导致毛细胞损伤在停药后仍可继续加重。

以上研究结果表明新牛儿对氨基糖甙类抗生素耳毒性可能有较高敏感性，另外在人类还存在氨基糖甙类抗生素耳毒性高度敏感家族，主要是由于其线粒体 12SrRNA 基因发生变异、导致线粒体功能异常[9]，所以新生儿应尽量避免使用该类药物。

参 考 文 献

[1] 药理学实验编写组，编. 药理学实验[M]. 北京：人民卫生出版社，1985：240－241.

(下转第 201 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

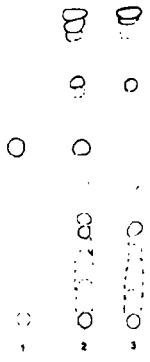


图 1 丹参的 TLC 鉴别

1、原儿茶醛 2、供试品 3、丹参空白

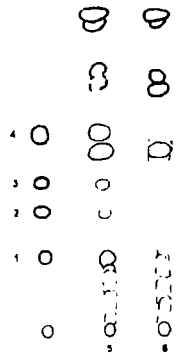


图 2 三七的 TLC 鉴别

1、人参总皂苷 Rg_1 2、人参皂苷 Rb_1 3、人参皂苷 Re 4、三七皂苷 R_1 5、供试品 6、三七空白

2.2.2 对照品溶液的制备 取人参皂苷 Rg_1、Rb、Re 及三七皂苷 R_1，加甲醇制成每 1ml 各含 1mg 的溶液，即得。

2.2.3 色谱条件 吸附剂硅胶 G；展开剂氯仿－甲醇－水(13:7:2)10℃ 以下放置分层的下层溶液；显色剂 10% 硫酸乙醇溶液；上样量 5～10μl。

2.2.4 结果 见图 2。

3 讨 论

3.1 心可舒胶囊中的原儿茶醛多以结合物形式存在，采用原标准[1]丹参中原儿茶醛的 TLC 鉴别常出现斑点不明显现象。按该修订方法检验，结果方法可行，易于定位。

3.2 在原标准基础上参考文献[2]增加了三七有效成份的鉴别，结果方法可行，稳定性好。

参 考 文 献

[1] 卫生部药典委员会. 卫生部药品标准，中药成方制剂第十五册[S]:23.

[2] 卫生部药典委员会. 中国药典 2000 年版 1 部[S]:附录 8.

(上接第 187 页)

[2] 丁大连. 豚鼠全内耳终器硝酸银染色法[J]. 上海第二医科大学学报，1989;4:326－327.

[3] Stockwell CW, Ades HW, Engstrom H. Patterns of hair cell damage after intense auditory stimulation[J]. Ann Otol Rhinol Laryngol, 1969;78:1148－1168.

[4] Henley CM, Rybak LP. Ototoxicity in developing mammals[J]. Brain Research, 1995;20:69－90.

[5] Schacht J. Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity [J]. Otolaryngol Clin North Am, 1993;26:845－856.

[6] Dolgova GV, Berezhinskaia VV, Firsov AA. Pharmacokinetics of amikacin in the perilymph and blood serum: An approach to the comparative evaluation of the potential ototoxicity of aminoglycoside antibiotics[M]. Antibiot Med Biotechnol, 1986;31:909－913.

[7] 王正敏，主编. 耳鼻喉科学新理论与新技术[M]. 上海：上海科技出版社，1997;16－22.

[8] Huy PTB, Meulemans A, Wassef M, et al. Gentamicin persistence in rat endolymph and perilymph after a two－day constant infusion[J]. Antimicrob Agents Chmother, 1983;23:344－346.

[9] Casano RA, Johnson DF; Bykhovskaya Y, et al. Inherited susceptibility to ammoglycoside ototoxicity genetic heterogeneity and clinical implication[J]. Am J Otolaryngol, 1999;20:151－156.