اثر نیتریک اکساید بر سمیت کلیوی جنتامایسین در کلیه مجزای موش صحرایی

رعنا غزنوی M.Sc.☆، مهدیه فقیهی Ph.D.☆♦، مهری کدخدایی Ph.D.☆، صدیقه شمس Ph.D.★
نسرین مکی B.Sc.★، فهیمه جعفری B.Sc.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، مرکز طبی کودکان

♦ آدرس مکاتبه : تهران، صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۷۳۱۳، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** تعیین اثر مهار یا افزایش تولید نیتریک اکساید (NO: Nitric Oxide) بر میزان سمیت کلیوی جنتامایسین در مدل کلیه مجزای موش صحرایی

* **مواد و روشها:** در گروههای شش گانه که هر گروه شامل هشت عدد موش صحرایی بود، پرفیوژن با بافر تیرود به تنهایی (گروه شاهد) یا همراه با ال-آرژی‌نین (گروه ۲)، ان-امگا-ال-آرژینین متیل استر (L-NAME) (گروه ۳) یا جنتامایسین (گروه ۴) و همچنین با بافر تیرود همراه با ال-آرژینین و جنتامایسین (گروه ۵) یا L-NAME و جنتامایسین (گروه ٦) انجام شد. در طی برقراری جریان، ادرار در زمانهای ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ دقیقه جمع آوری شد و میزان فعالیت آنزیمهای لاکتات دهیدروژناز (LD: Lactat Dehydrogenase) و آلکالن فسفاتاز (ALP: Alkalin Phosphatase) به عنوان شاخصهای سمیت سلولی در ادرار اندازه گیری شد.

* **یافته‌ها:** میزان فعالیت آنزیمها در گروههای ۲، ۳ و ۵ نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری نشان نمی‌دهد. در حالی‌که تفاوت گروههای ۴ و ٦ با گروه شاهد معنی‌دار است. همچنین تفاوت فعالیت آنزیمها در گروه ٦ نسبت به گروه ۴ افزایش معنی‌دار و در گروه ۵ نسبت به گروه ۴ کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

* **نتیجه‌گیری:** در شرایط مطالعه حاضر افزایش تولید NO سبب پیشگیری از سمیت کلیوی حاد جنتامایسین و مهار تولید آن موجب تشدید این سمیت می‌شود.

گل واژگان: نیتریک اکساید، جنتامایسین، کلیه مجزا

مقدمه

نیتریک اکساید در فیزیولوژی و پاتوفیزیولوژی کلیه نقش قابل توجهی دارد. یک نقش جالب NO، عملکرد آن در مدلهای مختلف نارسایی حاد کلیه کامل است. ARF[1] را می‌توان به طور تجربی به وسیله قطع موقتی جریان خون یا تجویز داروها از جمله جنتامایسین ایجاد کرد. بعضی مقالات اثرهای پیشگیری کننده از ARF برای NO را پیشنهاد می‌کنند (۱). از سوی دیگر؛ در برخی بررسیها اثرهای سمی برای NO گزارش شده است (۲، ۳). با توجه به نقش دوگانه NO که در مطالعات پیشین مطرح شده است، پژوهشگران در بررسیهای جدیدتر سعی دارند که با اختصاصی کردن و کوچکتر نمودن محدودهٔ عمل NO، جوانب مختلف اثرهای آن را در انواع مدلهای ARF روشن کنند. بنابراین استفاده از مدلهای توبول یا گلومرول یا کلیه کامل مجزا[2] در این مطالعات پیشنهاد شده است. در میان تحقیقات صورت گرفته، نقش تغییرات غلظت NO در سمیت حاد کلیوی جنتامایسین در مدل کلیه کامل مجزا بررسی نشده است که در مطالعه حاضر توجه شده است.

برخی مطالعات انجام شده، NO را به عنوان یک میانجی شیمیایی مؤثر در طی روند ARF مطرح می‌کنند. در مطالعات ابتدایی تصور می‌شد که عوارض ARF به دلیل کاهش عملکرد اندوتلیوم عروق در تولید EDRF[3] یا همان NO است. ولی مطالعات جدیدتر نشان می‌دهد که ارتباط بین NO و ARF پیچیده‌تر از یک کاهش ساده فعالیت NOS[4] اندوتلیومی است. در مورد نقش NO در پاتوفیزیولوژی ARF ابهام وجود دارد. از طرفی گزارشهای متعددی مبنی بر اثرهای محافظت کننده NO در مدلهای مختلف ARF وجود دارد. در مدل ARF ناشی از کلسترول بالا تجویز ال-آرژنین از لحاظ همودینامیک نتایج مفیدی را نشان می‌دهد (۴). در مطالعه Tom و همکاران نیز تزریق حاد ال-آرژنین در طی ایسکمی کلیوی از صدمات سلولی جلوگیری کرده است (۲). از طرف دیگر؛ در یک مطالعه نشان داده شد که استفاده از هموگلوبین به عنوان پاک کننده محیط از NO مانع از آسیب سلولی ناشی از تزریق نیتروپروساید سدیم (یک اهداکننده NO) می‌شود (۵).

Kabor و همکاران نتیجه بررسی خود روی لوله مجزا را به این ترتیب گزارش داده‌اند که استفاده از اینترلوکین یا لیپوپلی ساکارید باکتریایی تولید NO در لوله پروگزیمال را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد و باعث صدمه سلولی می‌شود (۶).

برای توجیه این تناقضات تئوریهای مختلفی وجود دارد. Tanaka و همکاران این اختلافها را به دز و طول مدت استفاده از ال-آرژنین و تنوع مدلهای آزمایشگاهی استفاده شده نسبت می‌دهند (۷). در یک بررسی گزارش شده که تزریق حاد ال-آرژنین در مدل کلیه دچار قطع موقت جریان خون موش مفید است ولی استفاده از ال-آرژنین به طور مزمن سبب بروز آثار سمی می‌شود زیرا صدمات حاصل از مقادیر زیاد NO فواید آن را می‌پوشاند (۲). در مطالعات دیگر عوامل محیطی از جمله فشار اکسیژن (۸)، موجود بودن کوفاکتورهای NOS (۱) و مولکولهای فلزی واسط (۹)، همچنین تنوع ژنتیکی (۱۰) را در عملکرد NO مؤثر دانسته‌اند.

برای مطالعه روی جوانب مختلف ARF مدلهای آزمایشگاهی متعددی از جمله مدل شناخته شده ARF ناشی از جنتامایسین استفاده می‌شود. در بررسی که Obatomi و همکاران انجام داده‌اند سمیت کلیوی حاد و مزمن جنتامایسین مطالعه شده است. در یک سری از گروهها لوله‌های پروگزیمال جدا شده تحت تأثیر دزهای مختلف جنتامایسین قرار گرفت. سنجش آنزیمهای سلولی موجود در ادرار از جمله لاکتات دهید رژوناز (LDH) و آلکالن فسفاتاز (ALP) برای بررسی سمیت کلیوی به کار برده شد. این پژوهشگران طبق این بخش از نتایج مطالعه خود پیشنهاد می‌کنند که اگر دز جنتامایسین در این مدل به اندازه کافی بالا باشد رهاشدن آنزیمها به داخل ادرار به صورت وابسته به زمان انجام می‌شود. برای بررسی سمیت مزمن؛ به مدت ده روز تزریق داخل صفاقی جنتامایسین انجام شد. در این روش نیز از روز سوم به بعد افزایش معنی‌دار میزان آنزیمها در ادرار نشانگر شروع ARF در این مدت بود (۱۱).

در چند مطالعه که به وسیله Rivas Cabanero و همکاران صورت گرفته، جنبه‌های مختلف تداخل جنتامایسین و سیستم تولید کننده NO بررسی شده است. در یک مطالعه استفاده همزمان L-NAME و جنتامایسین به مدت ۵ روز در مدل *in vivo* موجب افزایش سمیت کلیوی جنتامایسین شده است (۱۲).

این گروه در مطالعه بعدی خود نشان داده‌اند که تزریق جنتامایسین به موشها در طی چند روز باعث تکثیر و افزایش خاصیت انقباضی سلولهای مزانژیال همراه با افزایش بیان ژن NOS شده و در ادامه تولید NO را افزایش می‌دهد. احتمالاً این NO اضافی آثار جنتامایسین بر سلولهای مزانشیال را تعدیل می‌کند (۱۳).

مواد و روشها

در این مطالعه از موشهای صحرایی سفید تر با وزن ۲۱۰ تا ۲۴۰ گرم استفاده شد. روش انتخاب نمونه غیر تصادفی ساده بود. موشها در شش گروه هشت‌تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه ۱ (شاهد): پرفیوژن با محلول تیرود انجام و ادرار جمع آوری شد (۱۴).

گروه ۲ (ال-آرژنین): جریان محلول تیرود به کلیه‌ها برقرار شد. در دقیقه ۱۵ ال-آرژنین با غلظت ۲میلی‌مولار به محلول افزوده و ادرار جمع‌آوری شد (۱۵).

گروه ۳ (L-NAME): جریان محلول تیرود به کلیه‌ها برقرار شد. در دقیقه ۱۵ L-NAME با غلظت ۰/۱میلی‌مولار به محلول اضافه و ادرار جمع آوری شد (۱۵).

گروه ۴ (جنتامایسین): جریان محلول تیرود به کلیه‌ها برقرار شد. در دقیقه ۳۰ تزریق جنتامایسین به کلیه با غلظت ۰/۵میلی‌گرم در هر سی‌سی آغاز و ادرار جمع آوری شد (۱۶).

گروه ۵ (ال-آرژنین + جنتامایسین): جریان محلول تیرود به کلیه‌ها

1.Acute Renal Failure
2. Intact isolated kidney
3. Endothelium drived relaxing factor
4. No synthase

برقرار شد. در دقیقه ۱۵ ال-آرژنین و در دقیقه ۳۰ جنتامایسین را با غلظتهای فوق‌الذکر به مایع تیرود افزوده و ادرار جمع‌آوری شد.

گروه ۶ (L-NAME + جنتامایسین): جریان محلول تیرود به کلیه‌ها برقرار شد. در دقیقه ۱۵ L-NAME و در دقیقه ۳۰ جنتامایسین را با غلظتهای فوق‌الذکر به مایع تیرود اضافه کرده و ادرار جمع آوری شد.

برقراری جریان تیرود در تمامی گروهها به مدت ۱۱۵ دقیقه انجام و نمونه‌های ادرار در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ به مدت ۵ دقیقه جمع آوری شد.

مدل مورد استفاده در مطالعه حاضر، کلیه مجزای *In situ* است که طبق روش استفاده شده در مطالعات قبلی که در اینجا به اختصار شرح داده شده آماده گردید (۱۵، ۱۷). هدف از انجام جراحی در این مطالعه جایگزین کردن جریان خون کلیه‌ها با یک محلول فیزیولوژیک است. به این منظور محدوده‌ای از آئورت شکمی که شریانهای کلیوی از آن منشعب می‌شوند را مشخص کرده و پس از مسدود کردن همهٔ شریانهای منشعب شده از این بخش به جز شریانهای کلیوی و در نهایت مسدود کردن آئورت در قبل و بعد از محل انشعاب شریانهای کلیوی آئورت کانوله شده و جریان تیرود از آن طریق برقرار شد. پس از انجام جراحی و شروع جریان تیرود (به وسیله پمپ پریستالتیک مدل PR: Shimadzo) در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ نمونه ادرار در لوله‌های کوچک ۱/۵ سی‌سی جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایشهای بیوشیمیایی در فریزر نگهداری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمهای LDH و ALP با اتو آنالایزر (مدل هیتاچی ۷۰۴) انجام گرفت.

به منظور مقایسه میانگین فعالیت آنزیمها در گروههای مختلف، ارقام بدست آمده توسط نرم افزار SAS تحت آنالیز واریانس دو طرفه قرار گرفت. سپس با انجام تستهای نیومن-کولز و LSD[1] بررسی آماری میزان اختلافات انجام شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر با وجود اینکه رها شدن این آنزیمها به ادرار تا قبل از دقیقه ۷۰ تغییرات ناپایداری دارد اما از این زمان به بعد از یک الگوی معنی‌دار و قابل مقایسه پیروی می‌نماید که نشانگر وجود رابطه مستقیم بین میزان سمیت سلولی مورد انتظار و میزان فعالیت آنزیمها در ادرار است. از انجام آزمونهای ذکر شده نتایج زیر حاصل شد:

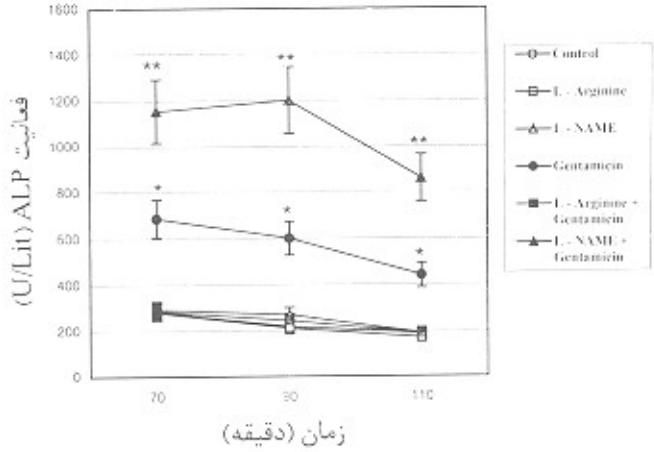
۱ ـ میزان فعالیت آنزیمها در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروههای ۲، ۳ و ۵ نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

۲ ـ میزان فعالیت آنزیمهای در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروه ۴ و ۶ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (به‌ترتیب با $P<0.01$ و $P<0.001$).

۳ ـ میزان فعالیت آنزیمها در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروه ۶ نسبت به گروه ۴ افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0.01$).

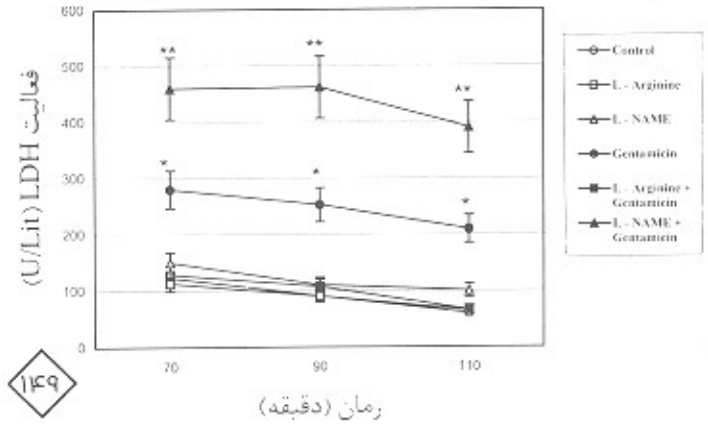
۴ ـ میزان فعالیت آنزیمها در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروه ۵ نسبت به گروه ۴ کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0.01$).

نتایج فوق در نمودارهای شماره ۱ و ۲ نمایش داده شده است.



نمودار ۱: مقایسه میانگینهای فعالیت آنزیم ALP ادرار در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروههای شش‌گانه

*: $P<0.01$, **: $P<0.001$



نمودار ۲: مقایسه میانگینهای فعالیت آنزیم LDH ادرار در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروههای شش‌گانه

*: $P<0.01$, **: $P<0.001$

بحث

طبق نتایج آماری مطالعه حاضر، تجویز جنتامایسین موجب افزایش معنی‌دار میزان دفع و در نتیجه میزان فعالیت آنزیمهای فوق‌الذکر در ادرار شده است.

افزایش دفع آنزیمها به خارج از سلول نشان دهنده اثر سمی جنتامایسین به دلیل از بین بردن جامعیت و همبستگی سلول است. در مطالعات متعددی از اندازه‌گیری فعالیت این آنزیمها برای بررسی نارسایی حاد کلیوی در موش صحرایی و انسان استفاده شده است (۱۸، ۱۹) تمامی این مطالعات میزان فعالیت این دو آنزیم را شاخص حساسی برای آسیب بخشهای مختلف لوله‌ها ذکر کرده‌اند و نتایج این مطالعات، ارزشمندی این شاخص را در بررسی سمیت کلیوی جنتامایسین تائید می‌کند. همچنین طبق نتایج آماری، فعالیت آنزیمها در ادرار تجویز همزمان L-NAME و جنتامایسین همزمان نسبت به تجویز جنتامایسین به تنهایی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. از آنجایی که L-NAME موجب مهار فعالیت NOS و کاهش تولید NO می‌شود، می‌توان گفت مهار تولید NO موجب افزایش سمیت کلیوی جنتامایسین

1. Least Significant Difference

می‌شود. در مطالعه Rivas cabanero و همکاران و Can و همکاران که اثر مهار NOS بر ARF ناشی از تجویز مزمن جنتامایسین را بررسی کرده‌اند، نتایج مشابهی با آنچه گفته شد به دست آمده است (۲۱، ۲۲).

در بخش دیگری از یافته‌های مطالعه حاضر مشاهده شد که تجویز همزمان ال-آرژینین و جنتامایسین رها شدن آنزیمهای سلولی از دیواره لوله‌های کلیوی را به میزانی می‌رساند که از لحاظ آماری با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد. از آنجایی که ال-آرژینین سوبسترای NOS بوده و موجب افزایش تولید NO می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که تولید NO از سمیت کلیوی حاد جنتامایسین جلوگیری می‌کند. مطالعه Can و همکاران نشان می‌دهد که در استفاده طولانی مدت از جنتامایسین نیز تجویز همزمان ال-آرژینین به حیوان موجب پیشگیری از ARF می‌شود (۲۲). همچنین در مطالعات Rivas cabanero و همکاران آمده است که ARF ناشی از جنتامایسین سبب افزایش تولید NO در سلولهای مزانژیال و گلومرول می‌شود که احتمالاً نقش NO در اینجا تعدیل آثار سمی جنتامایسین است (۱۲، ۱۳). نتایج به دست آمده در مطالعات فوق‌الذکر با اثرهای سودمند مشاهده شده NO که در مطالعه حاضر، همخوانی دارد.

این آثار را با توجه به اثرهای کلیوی NO و مکانیسم سمیت زای جنتامایسین می‌توان به ترتیب زیر توضیح داد. یکی از مکانیسمهای اصلی سمیت کلیوی جنتامایسین افزایش تولید رادیکالهای آزاد است که NO در این مورد می‌تواند به عنوان پاک کننده محیط از رادیکالهای آزاد عمل نماید. همچنین می‌توانند اثرهای جنتامایسین در افزایش مقاومت عروق کلیوی به دلیل آزاد شدن مواد تنگ کننده رگی (مانند اندوتلین ۱) را معکوس کند. این ماده در مورد افزایش خاصیت انقباضی سلولهای مزانژیال حاصل از جنتامایسین که منجر به کاهش GFR[1] می‌شود، نقش تعدیل کنندگی دارد. در نهایت می‌توان گفت که نیتریک اکساید می‌تواند از سمیت کلیوی جنتامایسین پیشگیری می‌کند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله از آقایان دکتر فتح‌اللهی، دکتر قادری و خانم بنا صادق در گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس که ما را در انجام این مطالعه صادقانه یاری کردند سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Suzuki E, Nagata D: Effects of tetra hydrobiptrin on endothelial dysfunction in rats with ischemic acut renal failure. J Am Soc Nephrol 2000; Feb: 301-309

2. Tom LA, Yu L, de-castro I, Compos SB, Segur AC: Benefical and harmful effects of L-arginine on renal ischeamia. Nephrol Dial Transplant 1999; May: 1139-1145

3. Traylor LA, Mayeux PR: Superoxide generation by renal proximal tubule nitric oxide synthase. Nitric Oxide 1997; Oct: 432-438

4. Yu L, Role Of nitrtc oxide in acute renal failure. Ren Fail 1997; May: 1139-1145

5. Yokozawa T, Chung HY, Kim DW, Goto H: Involvement of superoxide and/or nitric oxide in renal injury. Exp Toxicol Pathol 1999; Nov: 517-521

6. Goligorsky MS, Gross SS: Nitric oxide and the kidney: physiology and pathophysiology. Chapman and Hall, 1997, pp 22-175

7. Tanaka T, Nakanish T, Hasuike Y, Inoue T, Noguchi K, Tatamitsu Y: Paradoxical effects of L-arginine on nitric oxide in 5/6 nephrectomized SD rats. Nippon Jinzo Gakkaishi 1999; Dec: 754-763

8. Kelm M, Schrader J: Control of coronary vascular ton by nitric oxide. circulation Research 1990; 66: 1561-1575

9. Kabor AF, Denis M, Bergero MG: Association of nitric oxide production by kidney proximal tubular cells in response to lipopolysacharide and cytokines with

10. Herlitz H, Jungersten LU, Wikstrand J, Widgren BR: Effect of L-arginine infusion in normotensive subjects with and without a family history of hypertension. Kidney Int 1999; Nov: 1838-1845

11. Obatomi DK, Plummer DT: Renal damage caused by gentamicin. Toxicol Lett 1995; Jan: 75-83

12. Rivascabanero L, Montero A, Lopez JM: Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin- induced renal failure. Eur J pharmacol 1994; Jan 3: 119-121

13. Rivas cabanero L, Rodriguez A, Martinez C, Saura M, Lamas S, Lopez Novoa JM: Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. Exp Nephrol 1997; Jan-Feb: 23-30

14. Bagate K, Develiglu L, Imbs JL, Michel B, Helwig JJ: Vascular kinin B(1) and

(2) receptor- mediated effects in the rat isolated kidney. B J pharmacol 1999; Dec: 1643-1650

۱۵. علا شهرام، دهپور احمد رضا: بررسی اثر نیتریک اکساید بر سمیت کلیوی سرب در مدل کلیه پرفیوز شده. پایان نامه دکتری داروسازی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۷

16. Cojocel C, Hook JB: Effects of acute exposures to gentanicin on renal handling of proteins. Toxicogogy 1983; Nov: 347-356

17. Fulton D, Balazy M, McGiff JC, Quilleg J: Possible contribution of platelet cyclooxygenase to renal

1. Glomerular Filtration Rate

vascular action of 5, 6-Epoxyeicosatrionic acid. J pharmacol Exp therup 1995; 277: 1195-1199
18. Sandhya p, Mohandass S, Varalakshmi P: Role of Dl alpha lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity. Mol Cell Biochem 1995; Apr: 11-17
19. Schreiber S, Hamling J, Zehnter E, Howaldt S, Daerr W: Renal tubular dysfunction in patients with inflammatory bowel disease treated with aminosalicylate. Gut 1997; Jun: 761-766
20. Morel G, Bonnet P, Cossec B, Morel S, Cour C, Lambert AM, Roure MB, Brondeau MT: The role of glutathion and cysteine conjugates in the nephrotoxicity of o-xylene in rates. Arch Toxicol 1998; Sep: 553-558
21. Rivas cabanero L, Rodriguez A, Arevalo M, Lopez JM: Effect of NG-nitro-L-arginne methylester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. Nephron 1995; 71: 203-207
22. Cne C Sen S, Boztok N: Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. Eur J Pharmacol 2000; Mar: 324-334
cellular damage. Antimicrob Agents chemother, 1997, pp 557-562