

## اثر نیتریک اکساید بر سمیت کلیوی جنتامایسین در کلیه مجزای موش صحرائی

رعنا غزنوی <sup>\*M.Sc.</sup>، مهدیه فقیهی <sup>\*Ph.D.</sup>، مهری کدخدایی <sup>\*Ph.D.</sup>، صدیقه شمس <sup>\*Ph.D.</sup>

نسرين مکی <sup>\*B.Sc.</sup>، فهيمه جعفري <sup>\*B.Sc.</sup>

<sup>\*</sup> دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>\*</sup> دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، مرکز طبی کودکان

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۷۳۱۳-۱۴۱۵۵، 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 صحرائی

✱ **مواد و روشها:** در گروههای شش گانه که هر گروه شامل هشت عدد موش صحرائی بود، پرفیوژن با بافر تیروید 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 تیروید همراه با ال-آرژینین و جنتامایسین (گروه ۵) یا L-NAME و جنتامایسین (گروه ۶) 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 نمی دهد. در حالی که تفاوت گروههای ۴ و ۶ با گروه شاهد معنی دار است. همچنین تفاوت فعالیت آنزیمها در گروه ۶ نسبت به گروه ۴ افزایش معنی دار و در گروه ۵ نسبت به گروه ۴ کاهش معنی داری را نشان می دهد.

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

**کل 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<sup>۱</sup> را می‌توان به طور تجربی به وسیله قطع موفتی 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 محدوده عمل NO، جوانب مختلف اثرهای آن را در انواع مدل‌های ARF روشن کنند. بنابراین استفاده از مدل‌های توپول یا گلوبومول با کلیه کامل مجزا<sup>۲</sup> در این مطالعات پیشنهاد شده است. در میان تحقیقات صورت گرفته، نقش تغییرات غلظت NO در سمیت حاد کلیه 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<sup>۲</sup> یا همان NO است. ولی مطالعات جدیدتر نشان می‌دهد که ارتباط بین NO و ARF پیچیده‌تر از یک کاهش ساده فعالیت NOS<sup>۲</sup> 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-آرژینین از لحاظ همودینامیک نتایج مفیدی را نشان می‌دهد (۴). در مطالعه Tom و همکاران نیز تزریق حاد ال-آرژینین 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 اهدا کننده NO) می‌شود (۵).

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

برای توجیه این تناقضات تئوریهایی مختلفی وجود دارد. Tanaka و همکاران این اختلافها را به دز و طول مدت استفاده از ال-آرژینین و تنوع مدل‌های آزمایشگاهی استفاده شده نسبت می‌دهند (۷). در یک بررسی گزارش شده که تزریق حاد ال-آرژینین در مدل کلیه دچار قطع موقت جریان خون موش مفید است ولی استفاده از ال-آرژینین 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 آلکانان 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 معنی دار 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 نکثیر 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 نر با وزن ۲۱۰ تا ۲۴۰ گرم استفاده شد. روش انتخاب نمونه غیر تصادفی ساده بود. موشها در شش گروه هشت تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

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

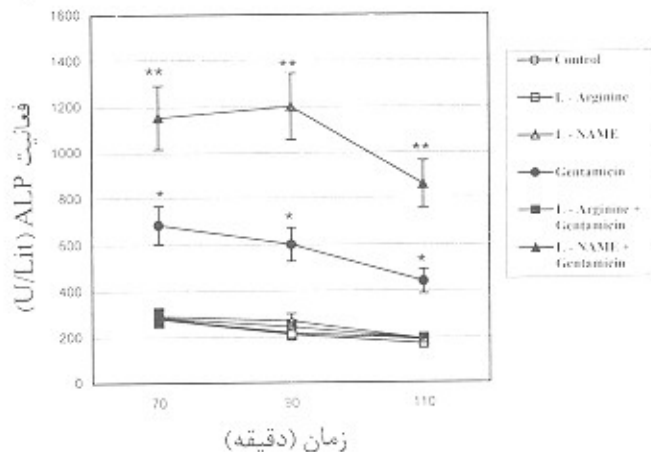
گروه ۲ (ال-آرژینین): جریان محلول تیروید به کلیه‌ها برقرار شد. در دقیقه ۱۵ ال-آرژینین با غلظت ۲ میلی مولار به محلول افزوده و ادرار جمع آوری شد (۱۵).

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

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

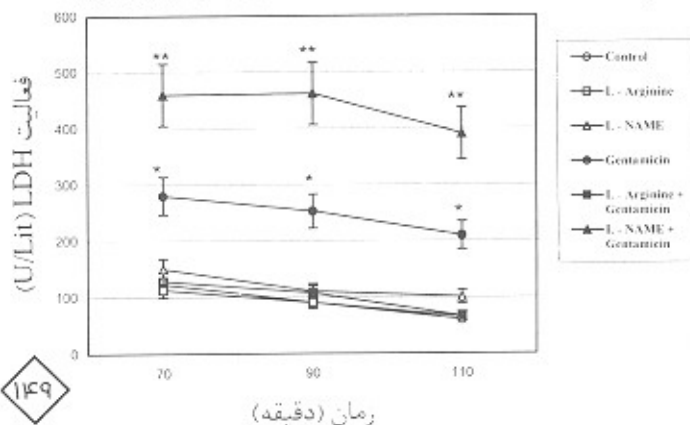
گروه ۵ (ال-آرژینین + جنتامایسین): جریان محلول تیروید به کلیه‌ها

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



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

۱۴۹

## بحث

طبق نتایج آماری مطالعه حاضر، تجویز جنتامایسین موجب افزایش معنی دار میزان دفع و در نتیجه میزان فعالیت آنزیمهای فوق الذکر 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 اندازه گیری 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 کرده اند. و نتایج این مطالعات، ارزشمندی این شاخص را در بررسی سمیت کلیوی جنتامایسین تأیید می کند. همچنین طبق نتایج آماری، فعالیت آنزیمها در ادرار تجویز همزمان L-NAME و جنتامایسین همزمان نسبت به تجویز جنتامایسین به تنهایی افزایش معنی داری را نشان می دهد. از آنجایی که L-NAME موجب مهار فعالیت NOS و کاهش تولید NO می شود، می توان گفت مهار تولید NO موجب افزایش سمیت کلیوی جنتامایسین

1. Least Significant Difference

برقرار شد. در دقیقه ۱۵ ال-آرژینین و در دقیقه ۳۰ جنتامایسین را با غلظتهای فوق الذکر به مایع تیروید افزوده و ادرار جمع آوری شد.

گروه ۶ (جنتامایسین+L-NAME): جریان محلول تیروید به کلیهها برقرار شد. در دقیقه ۱۵ L-NAME و در دقیقه ۳۰ جنتامایسین را با غلظتهای فوق الذکر به مایع تیروید اضافه کرده و ادرار جمع آوری شد. برقراری جریان تیروید در تمامی گروهها به مدت ۱۱۵ دقیقه انجام و نمونه های 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 محدوده های از آنورت شکمی که شریانهای کلیوی از آن منشعب می شوند را مشخص کرده و پس از مسدود کردن همه شریانهای منشعب شده از این بخش به جز شریانهای کلیوی و در نهایت مسدود کردن آنورت در قیل و بعد از محل انشعاب شریانهای کلیوی آنورت کانوله شده و جریان تیروید از آن طریق برقرار شد. پس از انجام جراحی و شروع جریان تیروید (به وسیله پمپ پرستالتیک مدل PR: Shimadzo) در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ نمونه ادرار در لوله های کوچک ۱/۵ سی سی جمع آوری و تا زمان انجام آزمایشهای بیوشیمیایی در فریزر نگهداری شد. اندازه گیری 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<sup>۱</sup> بررسی آماری میزان اختلافات انجام شد.

## یافته ها

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 معنی دار و قابل مقایسه پیروی می نماید 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- میزان فعالیت آنزیمها در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروههای ۲، ۳ و ۵ نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد.
  - ۲- میزان فعالیت آنزیمهای در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروه ۴ و ۶ نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان می دهد (P<0.001 و P<0.01).
  - ۳- میزان فعالیت آنزیمها در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروه ۶ نسبت به گروه ۴ افزایش معنی داری را نشان می دهد (P<0.01).
  - ۴- میزان فعالیت آنزیمها در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروه ۵ نسبت به گروه ۴ کاهش معنی داری را نشان می دهد (P<0.01).
- نتایج فوق در نمودارهای شماره ۱ و ۲ نمایش داده شده است.

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 پاک‌کننده محیط از رادیکالهای آزاد عمل نماید. همچنین می‌تواند اثرهای جنتامایسین در افزایش مقاومت عروق کلیوی به دلیل آزاد شدن مواد ننگ‌کننده رنگی (مانند اندوتلین ۱) را معکوس کند. این ماده در مورد افزایش خاصیت انقباضی سلولهای مزانژیال حاصل از جنتامایسین که منجر به کاهش GFR می‌شود، نقش تعدیل‌کنندگی 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 nitric 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 1. Glomerular Filtration Rate

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 گلوومرول 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

- nitric oxide production by kidney proximal tubular cells in response to lipopolysaccharide 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. Rivas cabanero 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
15. علا شهرام، دهبور 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 gentamicin on renal handling of proteins. Toxicology 1983; Nov: 347-356
17. Fulton D, Balazy M, McGiff JC, Quilleg J: Possible contribution of platelet cyclooxygenase to renal

vascular action of 5, 6-Epoxyeicosatrionic acid. J  
pharmacol Exp therup 1995; 277: 1195-1199

18. Sandhya p, Mohandass S, Varalakshmi P: Role of  
DI 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-arginine 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

