

UTICAJ ENALAPRILA NA KONCENTRACIJU UREJE I KREATININA U SERUMU I PATOHISTOLOŠKE PROMENE PRIKAZANE PAS METODOM U EKSPERIMENTALNOJ GENTAMICINSKOJ NEFROTOKSIČNOSTI

Milan Cirić, Slavimir Veljković, Mirjana Radenković, Snežana Cekić, Dragana Veličković, Milkica Nešić, Suzana Branković i Nenad Stojiljković

U našem radu je analizirano delovanje Enalaprila na glomerularne promene i deskvamaciju tubularnog epitela pacova u gentamicinskoj nefrotoksičnosti. U životinja tretiranih Gentamicinom (100 mg/kg tt/24 h) zabeležena je nekroza i deskvamacija epitela proksimalnih tubula i degenerativne promene na glomerulu. Morfološke promene nefrona, prikazane PAS tehnikom, bile su intenzivnije i ekstenzivnije simultanim delovanjem Enalaprila (1 mg/kg tt/24 h) i Gentamicina. U životinja tretiranih Gentamicinom je došlo do povećanja serumske koncentracije ureje ($p < 0,001$) i kreatinina ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja dok je kombinacija Enalaprila i Gentamicina ispoljila izraženiju nefrodestruktivnost od samog Gentamicina tako da je nivo serumske ureje ($p < 0,001$) i kreatinina ($p < 0,05$) bio veći u trećoj eksperimentalnoj grupi. U skladu sa biohemijskim promenama bile su i morfološke karakteristike nefrona. PAS bojenjem prikazane su degenerativne promene glomerula i posebno proksimalnih tubula. Dobijeni podaci idu u prilog činjenici da Enalapril dovodi do egzacerbacije gentamicinske nefrotoksičnosti. *Acta Medica Medianae* 2003; 42 (2): 13-16.

Ključne reči: Enalapril, deskvamacija proksimalnih tubula, PAS metoda, gentamicinska nefrotoksičnost

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu

Kontakt: Milan Cirić
Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta
Brace Tasković 81, 18000 Niš, Srbija i Crna Gora
Tel.: 018/326-644 lok. 132

Uvod

Gentamicin je jedan od značajnih nefrotoksičnih agenasa, izaziva akutnu bubrežnu slabost u 8 - 26% slučajeva (1).

Selektivnim nakupljanjem Gentamicina u korteksu bubrega nefrotoksičnost se u najvećoj meri ispoljava na nivou tubulointercijuma. Autoradiografskim studijama i studijama sa mikrodisekcijom nefrona pokazano je da se Gentamicin najviše nakuplja u proksimalnim tubulima (2).

Renalna oštećenja nastaju direktnim citotoksičnim dejstvom Gentamicina a neki autori ističu da je renalna dezintegracija u zavisnosti od oksidativnog stresa ćelije (3) i kalcijumskog dizbalansa.

Nefrotoksični efekti Gentamicina su po drugim autorima u korelaciji sa promenama na glomerulima. Gentamicin deprimira glomerularnu filtraciju umanjujući gustinu i dijаметar fenestri na endotelijalnim ćelijama kapilara glomerula (4).

Ističe se i značaj Angiotenzina II u genezi bubrežnih lezija Gentamicinom usled izmene hemodinamike. Navodi se da je blokiranje prooksidativnog,

vazokonstriktornog dejstva i hipoperfuzije Angiotenzina II uklopljeno u protektivno delovanje inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE) u gentamicinskoj nefrotoksičnosti (5). Međutim, postoje i mišljenja da inhibitori ACE mogu potencirati nefrodestruktivnost Gentamicina (6).

U našoj studiji želeli smo da na eksperimentalnom modelu bubrežne slabosti, kroz promene serumskih koncentracija ureje i kreatinina i PAS tehnikom verifikovanih patohistoloških transformacija bubrega sagledamo, da li Enalapril modifikuje nefrotoksične efekte Gentamicina kao i vrstu promena u pojedinim delovima nefrona.

Materijal i metode

Eksperimentalna sudija je izvedena na pacovima Wistar soja, oba pola, telesne težine oko 300 g, životnog doba oko 6 meseci, podeljenim u tri grupe po 8 životinja.

Prva grupa je bila kontrolna, dobijala je samo fiziološki rastvor.

Druga grupa je tretirana Gentamicinom u dozi od 100 mg/kg telesne težine.

Treća grupa je uz Gentamicin dobijala i Enalapril 1 mg/kg telesne težine.

Supstance su bile aplikovane intraperitonealno, osam dana, jednom dnevno.

Devetog dana nakon otpočinjanja eksperimenta životinje su bile žrtvovane. U krvi uzete iz aorte

određen je nivo ureje i kreatinina. Bubrezi su bili ekstirpovani i obradjeni standardnom PAS (periodic-acid shift) histološkom metodom za svetlosnu mikroskopiju.

Statistička značajnost razlika dobijenih rezultata utvrđena je Student T testom.

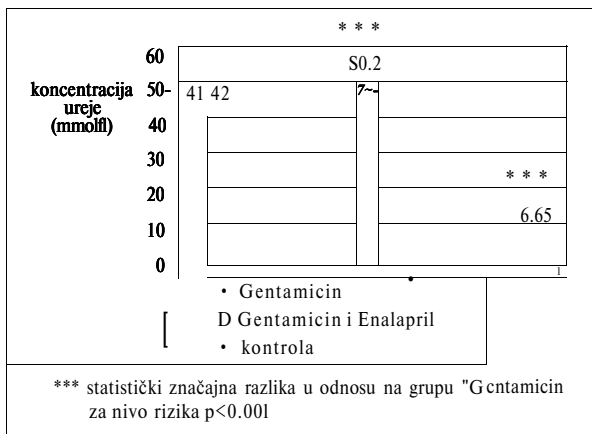
Rezultati

Biohemijski parametri

Vrednosti ureje u serumu bile su veće u drugoj ($p < 0,001$) i trećoj grupi ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Zabeležili smo i izraženiju elevaciju ureje u trećoj grupi u odnosu na drugu grupu životinja ($p < 0,001$) (tabela 1, grafikon 1).

Tabela 1. Koncentracija ureje, kreatinina (mmol/l) u serumu ispitivanih životinja

	kontrola	Gentamicin	Gentamicin Enalapril
ureja, X±SD	6,65±0,72	41,42±9,64	50,2±11,07
raspon	5,8-8,1	29,8-58,4	23,8-58,9
kreatinin, X±SD	67,6±10,89	390,8±14128	65,2±197,11
raspon	54-91	227-669	228-870

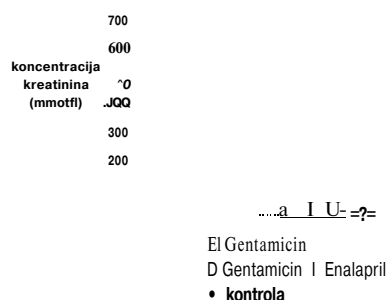


Grafikon 1. Vrednosti ureje u ispitivanih životinja

Nivo kreatinina takođe je bio statistički značajno veći u drugoj ($p < 0,001$) i trećoj grupi ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnom grupom. Kreatinemija je bila izraženija pod delovanjem Enalapрила i Gentamicina nego dejstvom samo Gentamicina ali je razlika bila statistički manje značajna ($p < 0,05$) (tabela 1, grafikon 2).

Morfološki nalazi

Nasi rezultati pokazuju da su u drugoj grupi životinja centralne promene bile zastupljene u korteksu bubrega. Mezangijum je bio normalno prisutan a kapsularni prostori u 2/3 slučajeva redukovani. Dominantne promene su postojale na proksimalnim

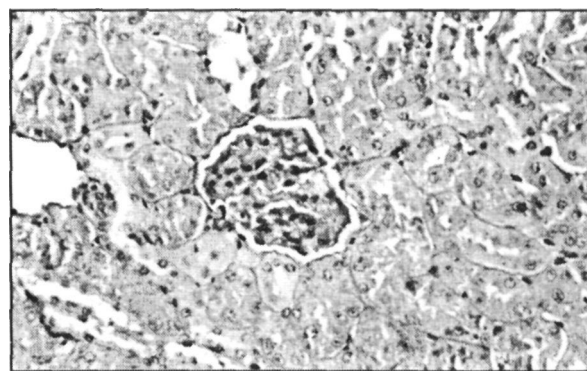


* statistički značajna razlika u odnosu na grupu "Gentamicin" za nivo rizika $p < 0,05$

*** statistički značajna razlika u odnosu na grupu "Gentamicin" za nivo rizika $p < 0,001$

Grafikon 2. Vrednosti kreatinina u ispitivanih životinja

tubulima, pretežno u subkapsularnim područjima koja izgledaju "šupljikavo" na mestima gde je lumen jako proširen a ćelije tubula izostaju. Parcijalni ili kompletni prekid bazalnih membrana proksimalnih tubula, PAS pozitivne partikule glikogena intracelularno kao i apikalno otkidanje delova ćelija može se takođe zapaziti na preparatima bojenim PAS metodom (slika 1).



Slika 1. Bubrež životinja tretiranih Gentamicinom. Deo korteksa sa parcijalnom nekrozom glomerula ali relativno očuvanim tuhularnim sistemom u čijim se ćelijama mogu videti partikule glikogena; primarne promene su na proksimalnim tubulima gde se posmatra apikalno otkidanje delova ćelija. PAS x 120

U životinja koje su dobijale Gentamicin i Enalapril registrovane su teške degenerativne promene u glomerulu i markantna deskvamacija epitela proksimalnih tubula.

Glomeruli su bili zastojni, kapsularni prostori često redukovani a u kapilarnim petljama mogla se uočiti segmentna nekroza uz redukciju ćelija. PAS primenjivost bazalnih membrana glomerula bila je "nerazgovetna" a bazalne membrane tubularnog sistema istanjene, razvlaknjene ili kompletno prekinute sa blede ružičastim PAS pozitivnim materijalom u vidu izmaglice u prostorima razorenih tubula (slika 2).

Diskusija

Poslednjih godina sve se češće beleži akutna insuficijencija i akutizacija insuficijencije bubrega



Slika 2. Bubrež životinja tretiranih Gentamicinom i Enalaprilom. Parcijalna nekroza glomerula, redukcija njihovih subkapsularnih prostora i delimična nekroza tubula pri čemu se, u relativno očuvanim tubulima, nalazi homogen ružičasti materijal. PAS x 120

nakon primene Gentamicina koji u grupi Aminoglikozida ima najveći nefrotoksični potencijal posle Neomicina (7).

Akutna bubrežna insuficijencija pracaena je redukcijom renalne frakcije, smanjenjem glomerulame filtracije, aktivacijom sistema renin-angiotenzin-aldosteron (RAA), smanjenjem reapsorpcije elektrolita, porastom azotnih ekvivalenata u krvi. Poremećaj glomerulame filtracije i povećana aktivnost sistema RAA u skladu sa hemodinamskim izmenama u bubrežgu, su po nekim autorima ključni efekti Gentamicina. Došlo se do ideje da se suprimiranjem sistema RAA, korekcijom hipoperfuzije bubrežga i isključenjem proksidativnog delovanja Angiotenzina II možda može modifikovati nefrodestruktivnost Gentamicina. Tako su Nabokov i saradnici (8) zaključili da ACE inhibitor Ramipril ima renoprotektivno dejstvo. Benigni i sar. (9) nalaze da je istovremenom blokadom i Angiotenzina II i Endotelina-1 u pacova sa membranoznom nefropatijom Trandolapril efikasniji kao renoprotektivni agens. Međutim, po saopštenjima koja su slična našim nalazima, Kaptopril uz dejstvo Gentamicina pojačava proteinuriju i azotemiju i dovodi do značajnijih histopatoloških transformacija bubrežga (6). Nalazi se i

da Perindopril intenzivira renalne lezije Gentamicina (10) kao i Kaptopril u uslovima hipokalijemije (11).

Neki istraživači su došli do podataka da Enalapril redukuje glomerularnu hipertenziju (12) a studije *in vitro* otkrivaju da je proliferacija humanih fetalnih mezangijalnih ćelija i glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova zavisna od Angiotenzina II tako da ACE inhibitor! redukovanjem ekspanzije mezangijalnih ćelija i hipertrofije glatko-mišićnog sloja krvnih sudova mogu usporiti razvoj glomeruloskleroze (13). U drugoj studiji je demonstrirana značajna redukcija krvnog pritiska, proteinurije i glomerulame i tubulointersticijalne fibroze pod uticajem ACE inhibitora Trandolapril ali je veći stepen renalne zaštite postignut simultanim tretmanom sa Verapamilom (14).

Uz osvrt na ranije nalaze ispitali smo efekte Enalaprila u uslovima kada je renalna funkcija već narušena Gentamicinom. Zabeležili smo postojanje biohemijskih i patohistoloških izmena bubrežga koje ukazuju na potenciranje gentamicinske nefrotoksičnosti Enalaprilom. Sposobnost Enalaprila da koriguje renalnu perfuziju u našem eksperimentu ne uslovljava poboljšanje bubrežne funkcije. Povećanje serumske koncentracije ureje i kreatinina pod dejstvom Enalaprila u poređenju sa efektima samog Gentamicina ukazuje na veći stepen disfunkcije nefrona. Ledirani tubulami sistem, posebno proksimalni tubuli ali i degenerativno izmenjeni glomeruli, umanjili su sposobnost bubrežga da odgovori zahtevima u ekskreciji ureje i kreatinina. Nekroza i deskvamacija epitelnih ćelija proksimalnih tubula bila je izraženija nakon primene Gentamicina i Enalaprila istovremeno.

U nekim tipovima bubrežne slabosti, u čijoj osnovi postoji ishemija bubrežga, primenom lekova koji izazivaju vazodilataciju u području bubrežga dobija se renoprotektivni efekat. Imajući u vidu da Enalapril izaziva vazodilataciju aferentne i eferentne arteriole bubrežga i da ne daje protektivni efekat u gentamicinskoj nefrotoksičnosti, moguće je da je toksičnost Gentamicina nezavisna od izmene hemodinamike na nivou nefrona ili da čak Enalapril svojim vazodilatatornim efektom povećava dospevanje Gentamicina u glomerul i proksimalni tubul (15).

Literatura

- Smith JH, Rush GF, Hook JB. Induction of renal and hepatic mixed function oxidases in the hamster and guinea-pig. *Toxicology* 1986; 38: 209-18.
- Silverblatt FJ, Kuenh C. Auto radiography of Gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 1984; 15: 335-45.
- Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 29(3): 465-77.
- Cojocel C, Docin B, Ceacmacudis E, Baumann K. Nephrotoxic effects of amino glycoside. Treatment on renal protein reabsorption and accumulation. *Nephron* 1984; 37: 113-19.
- Meyer TW. Why we block angiotensin II. *Kidney Int* 2000; 58:458-59.
- Niemczyk S, Ludwicka A, Groniowski M, Lewandowski Z, Hasse Z, Stopinski M. Nephrotoxicity of amino glycosides. III. Preventive studies with subcutaneous administration of converting enzyme inhibitor, captopril. *Pol Arch Med Wewn* 1991; 85(1): 19-26.
- Parker RA, Bennett WM, Porter GA. Animal models in the study of aminoglycoside nephrotoxicity. In: Whelton A., Neu H.S. ed. *The aminoglycosides: Microbiology, clinical use and toxicology*: New York, Basel, Marcel Dekker; 1982, pp. 235-67.
- Nabokov A, Amann K, Gassmann P, Schwarz U, Orth SR, Ritz E. The renoprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in experimental chronic renal failure is not dependent on enhanced kinin activity. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13(1): 173-6.

9. Benigni A, Corna D, Maffi R, Benedetti G, Zoja C, Remuzzi G. Renoprotective effect of contemporary blocking of angiotensin II and endothelin-1 in rats with membranous nephropathy. *Kidney Int* 1998; 54(2): 646-7.
10. Morin JP, Thomas N, Toutain H, Borghi H, Fillastre JP. Treatment with an angiotensin converting enzyme inhibitor may increase the nephrotoxicity of gentamicin in rats. *Pathol Biol* 1989; 37(5Pt): 652-6.
11. Klotman PE, Boatman JE, Volpp BD, Baker JD, Yarger WE. Captopril enhances amino glycoside nephrotoxicity in potassium-depleted rats. *Kidney Int* 1985; 28(2): 118-27.
12. Dworkin LD, Beinstein JA, Parker M, Tolbert E, Feiner DH. Calcium antagonists converting enzyme inhibitors reduce renal injury by different mechanism. *Kidney Int* 1993; (43):808-14.
13. Schneider M, Lerch M, Papiri M, Buechel L, Shaw S, Rigen W, et al. Metabolic neutrality of combined Verapamil-Trandolapril in contrast to B-blocker-low-dose chlortalidone in hypertensive type 2 diabetes. *J Hypertens* 1996; (14):669-77.
- U. Flores O, Arevaldo M, Gallego B, Hidalgo F, Vidal S, Lopez-Novoa J. Beneficial effect of the long-term treatment with combination of an calcium chanel blocker on renal injury in rats with 5/6 nephrectomy. *Exp Nephrol* 1998; (6):39-49.
15. Goldfarb D, Iana A, Serbon I, Govenda S, Kapuler S, Eliahon HE. Beneficial effect of verapamil in ischemic acute renal failure in the rat. *Proceedings of society for experimental biology and medicine* 1983; 172: 389-92.

THE EFFECTS OF ENALAPRIL ON UREA AND CREATININE SERUM CONCENTRATION AND PAS COLORING MORPHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL GENTAMICIN NEPHROTOXICITY

Milan Ćirić, Slavimir Veljković, Mirjana Radenković, Snezana Cekić, Dragana Velicković, Milkica Nesić, Suzana Branković and Nenad Stojiljković

The effects of Enalapril on glomerular changes and desquamation of tubular epithel in rats were analyzed in Gentamicin nephrotoxicity. It was detected necrosis and epithel desquamation of proximal tubules and degenerative changes in glomerular at animals treated by Gentamicin (100 mg/kg body mass/24 h). Nephron morphological changes were more intensive and extensive by simultaneous treatment of Gentamicin and Enalapril. In animals, treated by Gentamicin it appeared the increasing of urea ($p < 0,001$) and creatinine ($p < 0,001$) comparing to the control group. The combination of Enalapril and Gentamicin resulted bigger kidney damage then Gentamicin itself, so the level of urea concentration in serum ($p < 0,001$) and creatinine concentration ($p < 0,05$) was higher in the third experimental group. Our biochemical results are according to the PAS coloring morphological changes found in kidney. Consequently, our findings support hypothesis that Enalapril causes exacerbating of Gentamicin nephrotoxicity. *Acta Medica Medianae* 2003; 42 (2): 13-16.

Key words: Enalapril, desquamation of proximal tubules epithel, PAS coloring, Gentamicin nephrotoxicity