

BIOHEMIJSKE I MORFOLOŠKE PROMENE BUBREGA U GENTAMICINSKOJ NEFROTOKSIČNOSTI

*Milan Ćirić, Slavimir Veljković, Mirjana Radenković, Snežana Cekić, Dragana Veličković,
Milkica Nešić i Suzana Branković*

Cilj našeg istraživanja je ispitivanje uticaja Gentamicina na glomerule i tubularni sistem bubrega pacova. Patohistološkim pregledom bubrega životinja tretiranih Gentamicinom (100 mg/kg tt/24 h) verifikovane su degenerativne promene u korteksu. Promene su bile najizraženije u tubularnom sistemu, u vidu deskvamacije epitela proksimalnih tubula, dok je glomerule karakterisao zastoj krvi sa parcijalnom nekrozom kapilara. Nakon delovanja Gentamicina došlo je do smanjenja serumske koncentracije natrijuma ($p < 0,01$) i kalijuma ($p < 0,05$) i povećanja ureje ($p < 0,001$) i kreatinina ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja. Naši rezultati upućuju na zaključak da Gentamicin značajno morfofunkcionalno transformiše bubrege i dovodi do ispoljavanja bubrežne slabosti. *Acta Medica Medianae* 2004; 43 (1):23–27.

Ključne reči: *Gentamicin, pacov, deskvamacija tubularnog epitela, degeneracija glomerula*

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu

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

Uvod

Gentamicin je veoma efikasan antibiotik ali je i jedan od značajnih nefrotoksičnih faktora. Ključnu ulogu u ispoljavanju nefrotoksičnog potencijala Gentamicina ima koncentracija leka u bubregu. Zapaženo je selektivno nakupljanje Gentamicina u korteksu bubrega a zbog sposobnosti stvaranja visokog koncentracionog gradijenta u tubularnom sistemu, nefrotoksičnost se u najvećoj meri ispoljava u tubulointersticijumu. Dokazano je da se Gentamicin najviše nakuplja u proksimalnim tubulima (1,2).

Za renalna oštećenja je odgovorno direktno citotoksično dejstvo Gentamicina, ističe se da je renalna dezintegracija u zavisnosti od oksidativnog stresa ćelije (3,4) i kalcijumskog dizbalansa (5,6). Hipoksija epitelnih ćelija proksimalnih tubula, ćelija koje zavise od zbijanja u respiratornoj centrali zbog visoke metaboličke i enzimске angažovanosti, doprinosi razvoju nekroze i sledstvene deskvamacije.

Azotemija u gentamicinskoj nefrotoksičnosti je relativno kasna reperkusija. Nastaje usled depresije glomerularne filtracije, konsekvence ekstenzivne nekroze proksimalnih tubula (2).

Gentamicin deprimira glomerularnu filtraciju umanjujući gustinu i dijametar fenestri na endotelijalnim ćelijama kapilara glomerula (7) ali se standardnim

dozama obično ne smanjuje glomerularna filtracija, za manje od sedam dana tretmana dok se patološke promene na nivou proksimalnih tubula mogu zapaziti u biopsijskom materijalu i ranije (8).

Nefrotoksičnost se najčešće dokazuje određivanjem azotemije, prisustvom enzima u urinu koji vode poreklo iz celularnih struktura tubularnog epitela, određivanjem ekskrecije natrijuma, kalijuma, magnezijuma, kalcijuma, fosfata, glukoze – hidrosolubilnih materija koje se u fiziološkim uslovima obilno reapsorbuju u proksimalnim tubulima (7), pojavom cilindara, proteinurije i patohistološkim promenama.

Našim istraživanjem želeli smo da otkrijemo nefrotoksične efekte Gentamicina kao i vrstu promena u pojedinim delovima nefrona.

Materijal i metode

Istraživanje je izvedeno na pacovima Wistar soja oba pola, telesne težine oko 300 g, životnog doba oko 6 meseci, podeljenim u dve grupe po 8 pacova.

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

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

Supstance su administrirane intraperitonealno, osam dana, jednom dnevno a devetog dana, nakon žrtvovanja životinja, bubrezi su bili ekstirpovani i obrađeni standardnim histološkim metodama (HE i PAS bojenje) za svetlosnu mikroskopiju. U krvi uzete iz aorte, određen je nivo natrijuma, kalijuma, ureje i kreatinina.

Statistička značajnost razlika dobijenih rezultata utvrđena je Student T testom.

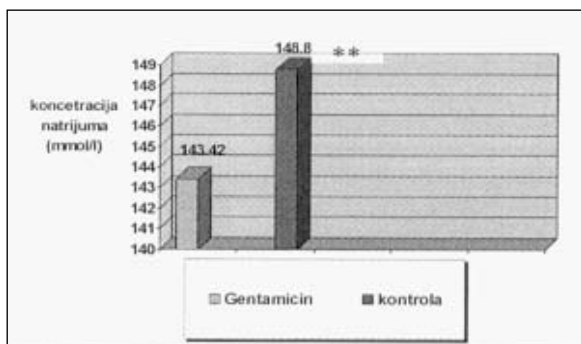
Rezultati

Biohemijski parametri

U odnosu na kontrolnu grupu životinja nađena je statistički značajno manja koncentracija natrijuma u serumu u drugoj ($p < 0,01$) (tabela 1, grafikon 1).

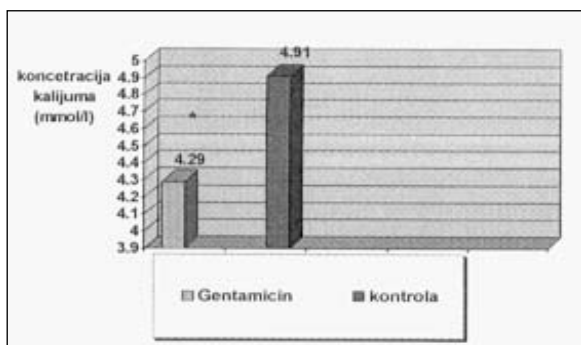
Tabela 1. Koncentracija natrijuma, kalijuma, ureje, kreatinina (mmol/l) u serumu ispitivanih životinja

	kontrola	Gentamicin
natrijum, X ± SD	148,87 ± 2,712	143,2 ± 3,067
kalijum, X ± SD	4,912 ± 1,115	4,29 ± 0,388
ureja, X ± SD	6,65 ± 0,72	41,42 ± 9,64
kreatinin, X ± SD	67,6 ± 10,89	390,8 ± 141,28



Grafikon 1. Vrednosti natrijuma u ispitivanih životinja

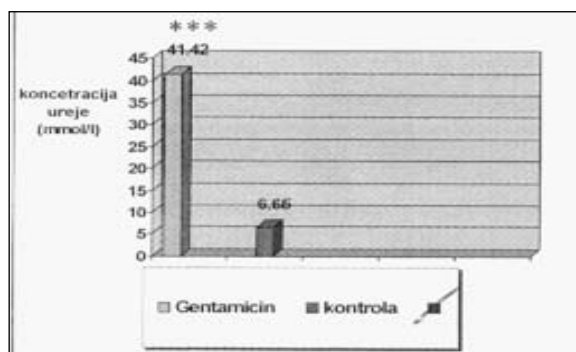
Koncentracija kalijuma u serumu druge grupe životinja je bila manja u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$) (grafikon 2).



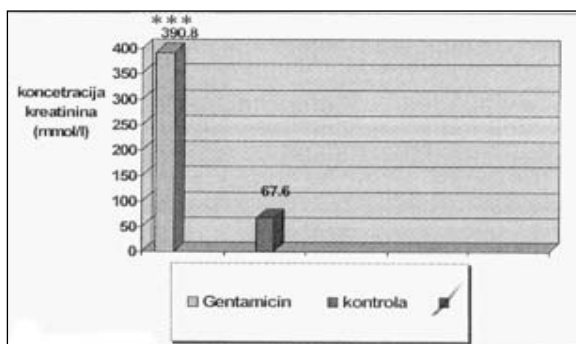
Grafikon 2. Vrednosti kalijuma u ispitivanih životinja

Vrednosti ureje u serumu su bile veće u drugoj grupi ($p < 0,001$) u odnosu na kontrolnu grupu životinja (grafikon 3).

Nivo kreatinina je takođe bio statistički značajno veći u drugoj grupi ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnom grupom (grafikon 4).



Grafikon 3. Vrednosti ureje u ispitivanih životinja



Grafikon 4. Vrednosti kreatinina u ispitivanih životinja

Morfološki nalazi

Na preparatima bubrega obrađenim HE metodom zapaženo je da su centralne promene bile zastupljene u korteksu bubrega. U glomerulima je postojao upadljiv ili umereni zastoj krvi, kapilari su bili dilatovani i ispunjeni zgusnutim eritrocitima; postojala je segmentna nekroza glomerula (slika 1).

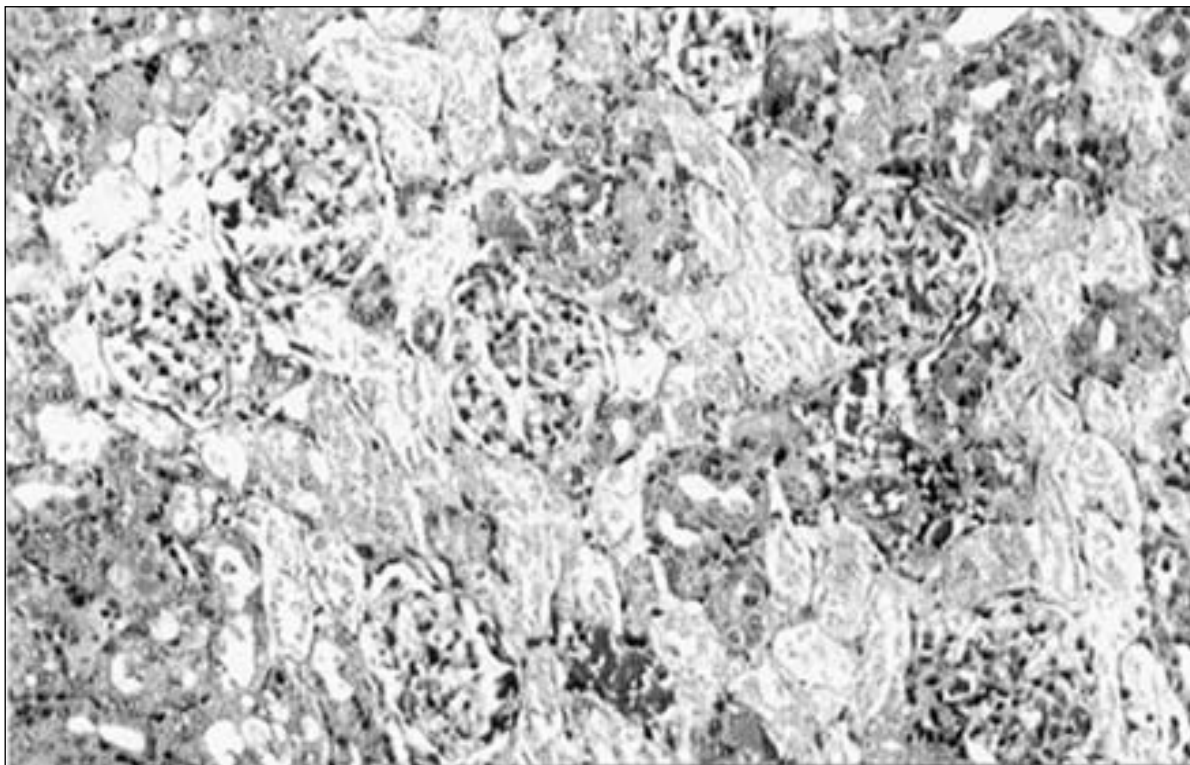
Mezangijum je bio normalno prisutan dok je kapsularni prostor glomerula u 2/3 slučajeva bio redukovan ili sveden na minimum (slika 2). U retkim slučajevima je subkapsularni prostor bio lako proširen kada je sadržao malu količinu ružičaste mase.

Dominantne promene su se nalazile u tubulima korteksa, pretežno u subkapsularnim prostorima bubrega, češće na proksimalnim tubulima. Na mestima gde su promene najizraženije sticao se utisak "šupljikavosti" korteksa, ćelije tubula su izostajale a lumen izgledao jako proširen (slika 3).

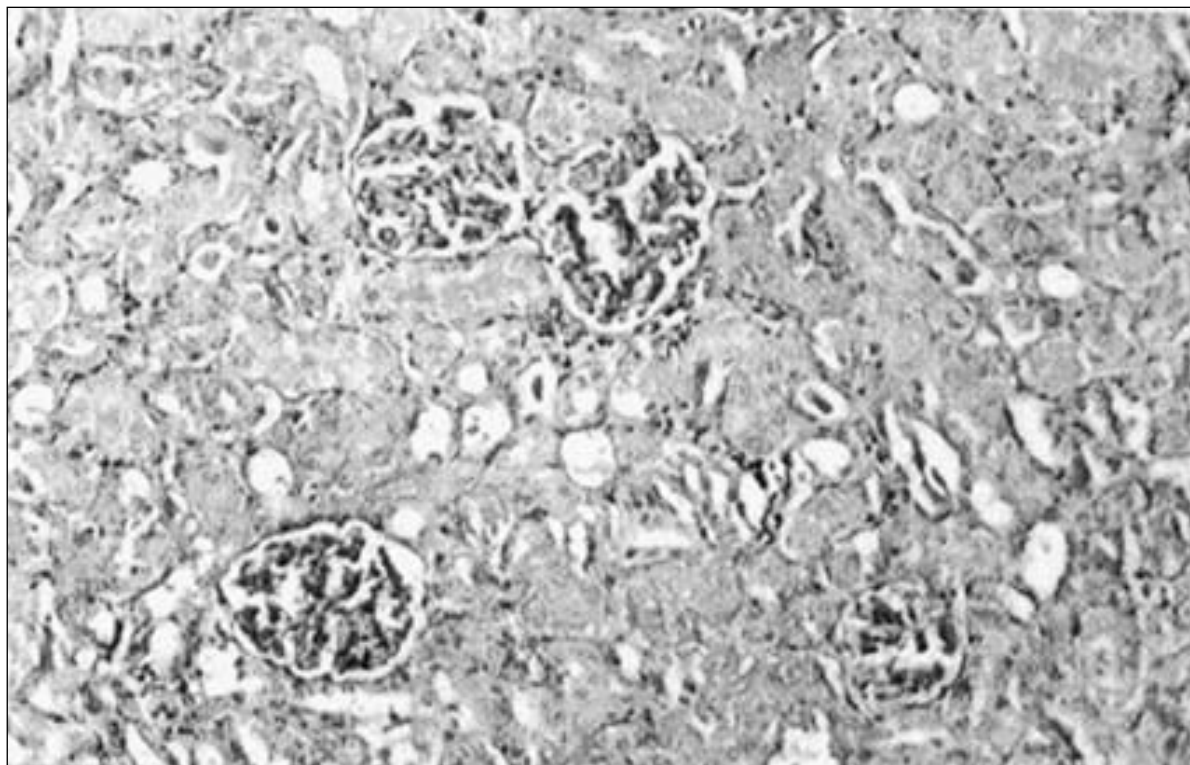
Na krvnim sudovima bubrega postojao je upadljiv zastoj krvi pretrombotičnog tipa, pretežno na venskom segmentu ali i u arteriolama korteksa. U meduli je zastoj pre svega u kapilarima, raspoređen poput "buketa" sudova između grupa tubula.

Na preparatima bojenim PAS metodom zapažen je parcijalni ili kompletni prekid bazalnih membrana tubula, naročito u subkapsularnim delovima korteksa; kod drugih slučajeva bazalne membrane su bile slabe prijemčivosti za PAS bojenje ili istanjene, razvlaknjene (slika 4).

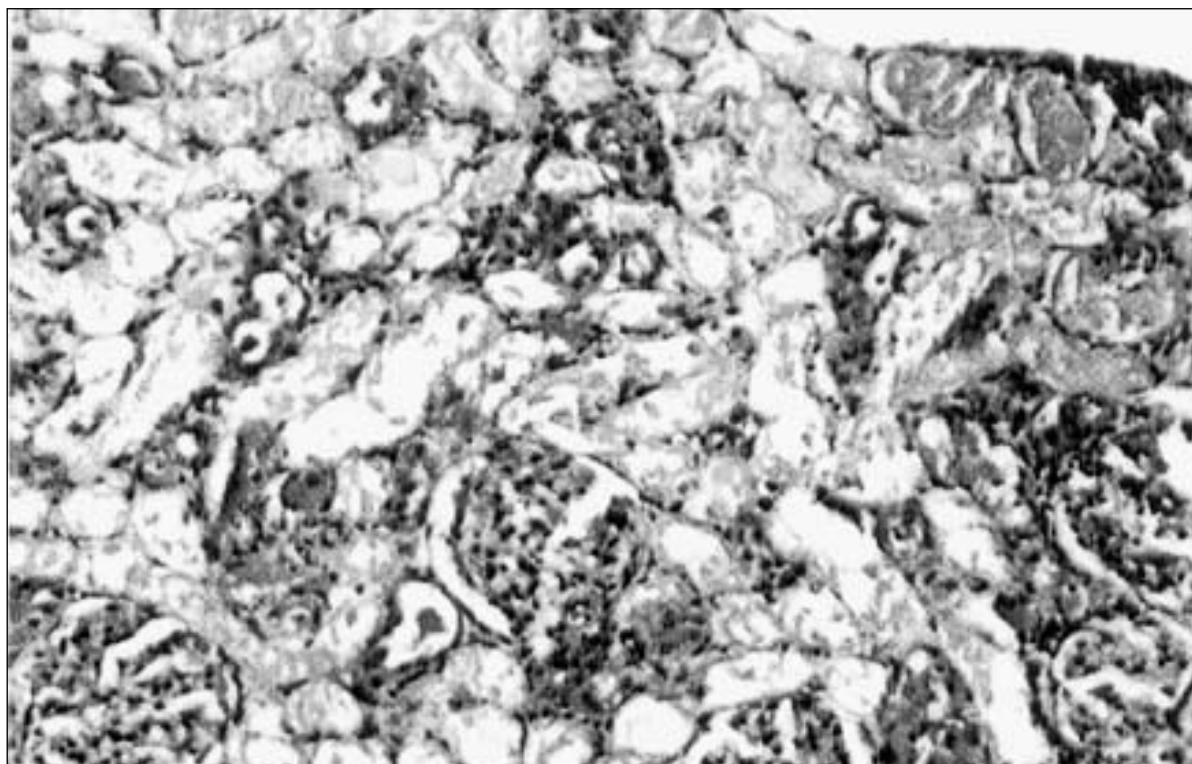
U lumenima tubula jukstamedularnog područja, u Henle-ovim petljama i sabirnim kanalicima, nalazili su se crveni, prijemčivi za PAS, hijalini cilindri.



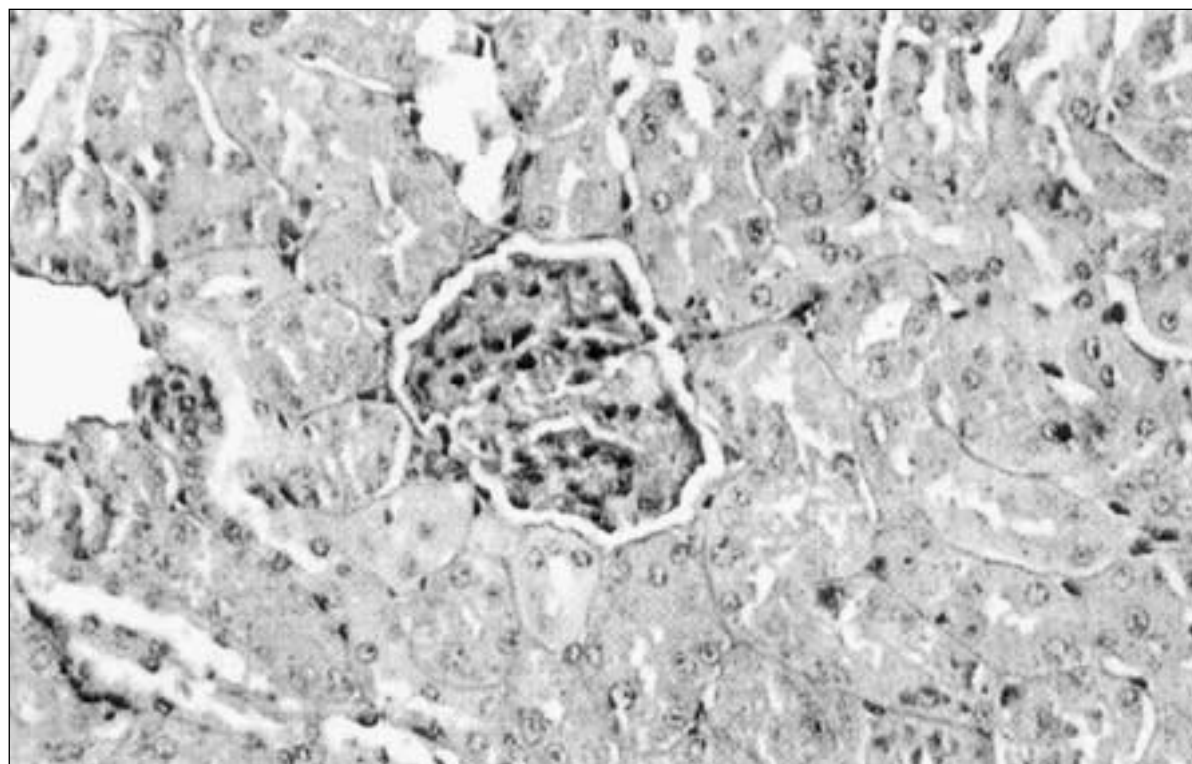
Slika 1. Bubrež životinja tretiranih Gentamicinom. Jak zastoj u glomerularnom i intersticijalnom prostoru, upadljiva redukcija subkapsularnog glomerularnog prostora i subtotalna nekroza glomerula sa periglomerularnom nekrozom tubula, mestimično sa tubuloreksom. HE x 100



Slika 2. Bubrež životinja tretiranih Gentamicinom. Naglašena lobularnost glomerula i redukcija subkapsularnog prostora; obliteracija lumena dela tubula zbog prisustva nekrotične ćelijske mase i dosta ružičastih "čepova" u lumenima relativno očuvanih tubula. HE x 120



Slika 3. Bubrež životinja tretiranih Gentamicinom. “Šupljikavi” izgled tubula korteksa usled nekroze i deskvamacije epitela; glomeruli pokazuju zastoj i parcijalnu nekrozu. HE x 120



Slika 4. Bubrež životinja tretiranih Gentamicinom. Deo korteksa sa parcijalnom nekrozom glomerula ali relativno očuvanim tubularnim 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

Takođe su u citoplazmama ćelija nekih tubula korteksa zapažene zrnaste homogene crveno bojene strukture kao i homogeni crveni pojas luminalnog dela tubularnih ćelija, moguće četkastih ivica, naročito onih tubula čije epitelne ćelije nisu zahvaćene degenerativno – nekrotičnim procesima.

Diskusija i zaključak

Primenu Gentamicina često prate nefrodegenerativni efekti. Nefrotoksično dejstvo Gentamicina podstiču faktori komorbiditeta, posebno hipovolemija izazvana diureticima, acidoza, hiponatrijemija, hipokalcijemija, hipomagnezijemija, (9) kao i frekventno doziranje. Gentamicin češće pogoršava bubrežnu funkciju u uslovima kada je patološki proces već zahvatio bubrege.

Mada precizni mehanizmi geneze akutne bubrežne slabosti usled delovanja Gentamicina nisu potpuno razjašnjeni veruje se da procesi degeneracije glomerula i procesi nekroze i deskvamacije epitela proksimalnih tubula, nastali usled delovanja slobodnih

radikala kiseonika i autolitičkih enzima lizozoma, uslovljavaju retenciju azotnih jedinjenja i renalni gubitak elektrolita.

Renalni gubitak hidrosolubilnih materija koje se u fiziološkim uslovima obilno reapsorbuju u proksimalnim tubulima ukazuje na postojanje gentamicinske nefrotoksičnosti. (Cojocel i sar. 1984). Mi beležimo povećan gubitak natrijuma i kalijuma urinom a u isto vreme i elevaciju azotnih ekvivalenata u krvi što otkriva disfunkciju tubularnog sistema. Funkcionalni integritet bubrega sagledan kroz biohemijske parametre u našem radu, imao je i svoj morfološki supstrat. Degenerativno izmenjeni glomeruli i posebno proksimalni tubuli, uslovljavali su umanjenje ekskretornih i reapsorptivnih sposobnosti bubrega tako da se to odrazilo i na promene u serumu. U različitim eksperimentima na životinjama je pokazano da nefrotoksičnost Gentamicina može varirati od subcelularnih lezija epitelnih ćelija i reverzibilnih funkcionalnih promena, do nekroze tubularnog sistema i akutnog ispada bubrega.

U zaključku možemo reći da Gentamicin ispoljava značajan stepen nefrodestruktivnosti.

Literatura

1. Morin JP, Viotte G, Vanderwalle A, Van Hoff F, Tulkes P, Fillastre JP. Gentamicin-induced nephrotoxicity: a cell biology approach. *Kidney Int* 1980; 18: 583–90.
2. Silverblatt FJ, Kuenh C. Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* 1984; 15: 335–45.
3. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 29(3): 465–77.
4. Yang CL, Du XH, Han YX. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail.* 1995; 17(1): 21–6.
5. Moore MA, Nakamura T, Shirai T, Ito N. Immunohistochemical demonstration of increased glucose-6-phosphate dehydrogenase in preneoplastic and neoplastic lesions by propyl nitrosamines in F rats and Syrian hamsters. *Gann* 1986; 77: 131–8.
6. Pounds JG, Rosen JF. Cellular Ca⁺⁺ homeostasis and Ca⁺⁺-mediated cell processes as critical targets for toxicant action: conceptual and methodological pitfalls. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 94: 331–41.
7. Cojocel C, Docin B, Ceacmacudis E, Baumann K. Nephrotoxic effects of aminoglycoside. Treatment on renal protein reabsorption and accumulation. *Nephron* 1984; 37: 113–9.
8. DeBroe ME, Paulus GJ, Verpooten GA, Roels F, Buysens A, Wedeen R, et al. Early effects of gentamicin, tobramycin and amikacin on the human kidney. *Kidney Int* 1984; 25: 643–52.
9. Fillastre JP, Godin M, Benairdjan J. Toxicite renale de l'Amikacin. *Nouv Presse Med* 1979; 8: 42 – 6.

BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL RENAL CHANGES IN GENTAMICIN NEPHROTOXICITY

Milan Ćirić, Slavimir Veljković, Mirjana Radenković, Snezana Ćekić, Dragana Velicković, Milkica Nesic and Suzana Branković

The aim of the research is to analyze glomerular and tubular epithel changes in Gentamicin nephrotoxicity. Degenerative changes were detected in cortex of animals treated by Gentamicin were detected (100 mg/kg body mass/24 h). The nephron morphological changes were the most intensified in tubular system: as desquamation of proximal tubules and necrosis in glomerular capillary loops. In animals, treated by Gentamicin the decreasing of sodium serum concentration ($p < 0,01$) and potassium ($p < 0,05$) took place while there was the increasing of urea ($p < 0,001$) and creatinine ($p < 0,001$) comparing to the control group. Our biochemical and morphological findings support hypothesis that Gentamicin causes exacerbation of renal function and lead to kidney insufficiency. *Acta Medica Medianae* 2004; 43(1): 23–27.

Key words: *Gentamicin, rat, desquamation of proximal tubules epithel, degenerative changes in glomerular*