

EFEKTI VERAPAMILA NA SERUMSKU KONCENTRACIJU NATRIJUMA I KALIJUMA I PATOHISTOLOŠKE PROMENE PRIKAZANE HE METODOM U EKSPERIMENTALNOJ GENTAMICINSKOJ NEFROTOKSIČNOSTI

Mla n Ćirić*, S lavi m r Veljković*, Mirjana Radenković*, Snežana Ćekić*, Dragana Veličković*,
Milkica Nešić*, Suzana Branković* i Boris Đinđić**

Analizirano je delovanje verapamila na segmente nefrona bubrega pacova u gentamicinskoj nefrotoksičnosti. U životinja tretiranih gentamicinom (100 mg/kg tt/24 h) zabeležene su značajne promene u korteksu, posebno na proksimalnim tubulima i manje na glomerulima. Smanjenje koncentracije natrijuma u serumu bilo je statistički značajno u odnosu na kontrolnu grupu za razliku od smanjenja koncentracije kalijuma u plazmi životinja tretiranih gentamicinom. Na protektivnu ulogu verapamila u gentamicinskoj nefrotoksičnosti ukazuju i u manjem stepenu izražene promene serumskih koncentracija natrijuma i kalijuma, nakon istovremenog delovanja verapamila i gentamicina u odnosu na grupu tretiranu gentamicinom kao i, morfološke karakteristike nefrona. HE tehnika otkriva manje izražene morfološke promene subkapsularnog prostora glomerula, kapilarnih zidova i tubularnog sistema usled kombinovanog delovanja verapamila (3 mg/kg tt/24 h) i gentamicina. Ovim nalazima se podupire činjenica da verapamil protektivno deluje u gentamicinskoj nefrotoksičnosti. *Acta Medica Medianae* 2004; 43(2): 9-12.

ključne reci: verapamil, protektivna uloga, HE metoda, gentamicinska nefrotoksičnost

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu*
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu **

Kontakt: Milan Ćirić
Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta
Bulevar Dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Srbija i Crna Gora
Tcl.: 018/326-644 lok. 132

tololke lezije (6) dok Brashier i sar. (7) dokazuju da kalcijum i.v. administriran redukuje nefrotoksičnost gentamicina.

Uvod

Gentamicin se ubraja u značajne nefrotoksične agense. Nefrotoksičnost se u najvećoj meri ispoljava u tubulointercijumu korteksa bubrega zbog selektivnog nakupljanja, posebno u proksimalnim tubulima (1). Dejstvo gentamicina je direktno citotoksično ali se renalna dezintegracija povezuje i sa oksidativnim stresom ćelije (2) i sa kalcijumskim dizbalansom (3).

Verapamil, organski kalcijumski antagonist iz grupe nifedipina i diltiazema, blokira ulazak jona kalcijuma u ćeliju kroz spore voltažno zavisne kalcijumske kanale. Sprečavanjem transmembranskog influksa kalcijuma se mogu, supresijom kalcijum zavisne sinteze vazokonstriktora Endotelina-1, po nekim autorima, umanjiti bubrežne lezije (4). Smanjenje influksa kalcijuma u ćelije oštećene ishemijom se, takođe, ističe kao i značaj vazodilatatornih hormona u zaštiti bubrega od delovanja gentamicina (5).

Postoje i nalazi među literaturnim podacima koji govore o drugačijoj ulozi kalcijum antagonista u gentamicinskoj nefrotoksičnosti. Jednom opservacijom se saznaje da verapamil ne umanjuje funkcionalne i his-

Cilj rada

U našem radu smo na eksperimentalnom modelu bubrežne slabosti, praćenjem promena serumskih koncentracija natrijuma i kalijuma i HE pretragom patohistoloških promena bubrega želeli da sagledamo, da li verapamil utiče na nefrotoksične efekte gentamicina kao i segmentne promene nefrona.

Materijal i metode

Istraživanje je izvedeno na pacovima VVistar soja, oba pola, telesne težine oko 300 g, životnog doba oko 6 meseci. Podeljene u tri grupe po 8, životinje su bile tretirane osam dana, jednom dnevno, intraperitonealnom aplikacijom:

- prva grupa, kontrolna, samo fiziološkim rastvorom,
- druga grupa gentamicinom u dozi od 100 mg/kg telesne težine,
- treća grupa gentamicinom i verapamilom, 3 mg/kg telesne težine.

Devetog dana životinje su bile žrtvovane a u krvi uzete iz aorte, određen je nivo natrijuma i kalijuma.

Bubrezi su bili ekstirpovani i obrađeni standardnom HE (hematoxilin-eosin) histološkom metodom za svetlosnu mikroskopiju. 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 serumskog natrijuma grupe životinja koja je tretirana gentamicinom ($p < 0,01$). Simultanim delovanjem gentamicina i verapamila izazvan pad koncentracije natrijuma u serumu nije bio statistički značajan u odnosu na kontrolnu grupu ali je postojala veća koncentracija natrijuma u odnosu na grupu tretiranu samo gentamicinom (tabela 1, grafikon 1).

Koncentracija kalijuma u serumu grupe životinja koja je bila pod gentamicinom i grupe koja je bila pod gentamicinom i verapamilom bila je manja od koncentracije u serumu kontrolne grupe životinja. Razlika, u odnosu na kontrolnu grupu, nije bila statistički značajna. Pod dejstvom verapamila nivo kalijuma u serumu je manje opao nego pod dejstvom gentamicina ($p > 0,05$) (grafikon 2).

Morfološki nalazi

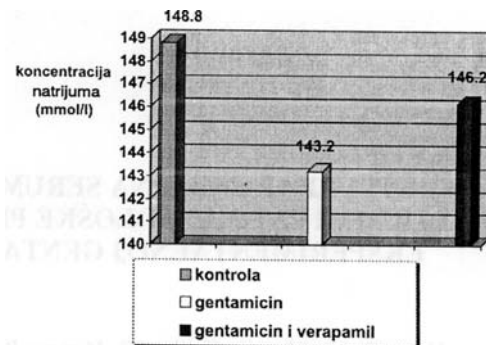
U pacova tretiranih gentamicinom najizraženije promene su u korteksu, u proksimalnim tubulima, dok su lezije glomerula manje. U glomerulima se zapaža upadljiv zastoj krvi i segmentna nekroza sa redukcijom subkapsularnog prostora. Kortikalni tubularni sistem je lediran za razliku od jukstamedularnog i medularnog

Tabela J. Koncentracija natrijuma i kalijuma (mmol/l) u serumu ispitivanih životinja

	Kontrola	Gentamicin	Gentamicin Verapamil
Na ⁺ , X±SD	148,8712,712	143,2 ± 3,067	146,2813,368
raspon	146-153	139-149,4	141-151
K ⁺ , X±SD	4,9111,115	4,29 ± 0,388	4,42 ± 0,824
raspon	3,7 - 6,5	3,5-4,6	3,5-5,8

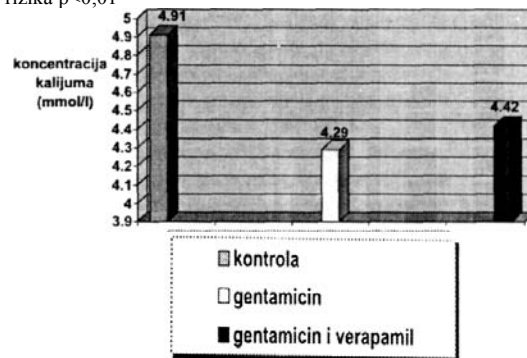
sistema u čijim lumenima postoji sadržaj iz oštećenih proksimalnih partija. Gentamicin izaziva deskvamaciju epitela proksimalnih tubula. Tubuli su prošireni, ispunjeni hijalinihim cilindrima i delovima zgrudvane citoplazme, najčešće bez jedara. Na venskim krvnim sudovima bubrega ali i u arteriolama korteksa uočava se upadljiv zastoj krvi pretrombotičnog tipa. Postoje i mala polja perivaskulame hemoragije a na nekim uzorcima bubrega pojedinih eksperimentalnih životinja i perivaskularni limfo-plazmocitni infiltrati, naročito u zoni arkuatnih sudova (slika 1).

Na HE preparatima bubrega životinja koje su istovremeno bile tretirane gentamicinom i verapamilom uočava se da je prostor ispod Boumanove čaure glomerula umereno redukovan, bez sadržaja a glome-



Grafikon 1. Vrednosti natrijuma u ispitivanih životinja

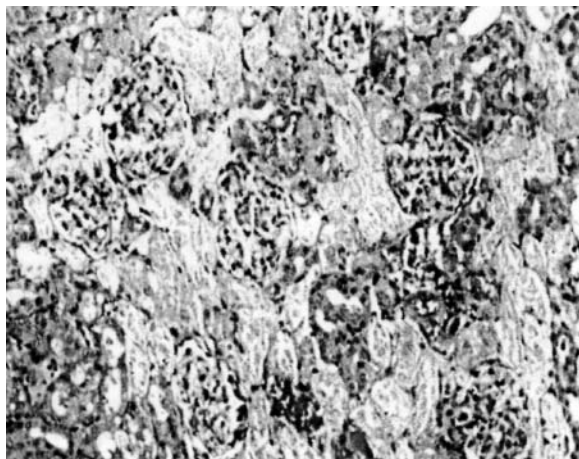
* statistički značajna razlika u odnosu na grupu "Gentamicin" za nivo rizika $p < 0,01$



Grafikon 2. Vrednosti kalijuma u ispitivanih životinja

* statistički značajna razlika u odnosu na grupu "Gentamicin" za nivo rizika $p < 0,01$

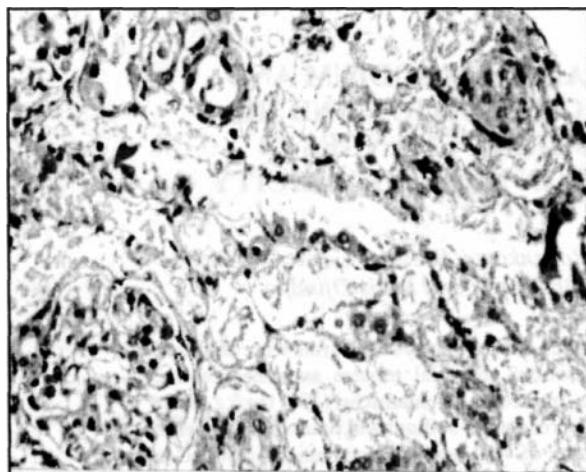
ruli zastojni, mestimično nekrotičnih kapilarnih zidova ili redukovanih ćelija. Tubuli korteksa su nejednakih promena, od potpune nekroze tubula sa karioreksom do, relativno očuvanih područja sa zamućenom, zgrušanom i hidropično-vakuolarnom citoplazmom koja često puni lumene tubula. Retko se vide tubuli apatiranog epitela, ispunjeni homogenom ružičastom masom. Na nekim preparatima je zastoj naglašen na kortiko-medularnoj granici u malim mišićnim arterijama i arteriolama, gde često dobija pretrombotični karakter (slika 2). Tubuli kortiko-medularnog pojasa su očuvani uz redukciju lumena. Homogeni ružičasti materijal je prisutan u tubulima medule i kortiko-medularne granice, naročito u Henle-ovim petljama, ali uz očuvanje epitela (slika 3).



Slika 1. Bubrež životinja tretiranih gentamicinom. Zastoj na glomerularnom i intersticijalnom prostoru, upadljiva redukcija subkapsularnog prostora i suhtotalna nekroza glomerula sa periglomerularnom nekrozom tuhula i mestimično tuhuloreksom. HE x 100



Slika 3. Bubrež životinja tretiranih gentamicinom i verapamilom. Očuvanost tuhularnog sistema i homogena ružičasta masa u lumenima medularnih tubula. HE x 120



Slika 2. Bubrež životinja tretiranih gentamicinom i verapamilom. Tubulonekroza većine tubula sa relativnom očuvanošću glomerula i zastoj krvi. HE x 150

Diskusija

Primena gentamicina često dovodi do funkcionalne slabosti bubrega koju prati smanjenje renalne frakcije, veličine glomerularne filtracije, reapsorpcije elektrolita i retencija finalnih produkata metabolizma. Smatra se da su efekti zavisni od vazokonstrukcije tako da su neki istraživači, supresijom kalcijum zavisne sinteze vazokonstriktora Endotelina-1, postigli umanjene bubrežnih lezija što su potvrdili smanjenjem renalnih enzima u urinu (4).

Drugi autori su zapazili da tkivna akumulacija kalcijuma korelira sa smanjenjem klirensa kreatinina i prostranstvom letalnog celularnog oštećenja u tubulima čime, takođe, ističu značaj vazodilatatornih hormona i akumulacije kalcijuma u bubregu oštećenog gentamicinom (5).

Protektivna uloga verapamila u gentamicinskoj nefrotoksičnosti ističe se i dokazivanjem postojanja kompetitivnog odnosa verapamila i gentamicina prema

zajedničkom transportnom sistemu ćelijske membrane, praćenjem njihovih efekata na transportni sistem "braš border" membranskih vezikula (8).

Efekti verapamila u našem istraživanju su u skladu sa rezultatima navedenih radova ali postoje i nalazi po kojima verapamil može potencirati gentamicinsku nefrotoksičnost. Tako istraživanje na belim zečevima koji su bili tretirani gentamicinom, kalcijum-hloridom i verapamilom, otkriva da je nakupljanje gentamicina u bubregu intenzivnije sudelovanjem kalcijum antagonista (9). Slično objavljuju i Brashier i sar. (7). Mi nalazimo postojanje biohemijskih i patohistoloških izmena bubrega koje ukazuju na smanjenje gentamicinske nefrotoksičnosti verapamilom.

Koncentracija natrijuma u serumu bila je manja u drugoj i trećoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu životinja, dok je natrijemija u trećoj grupi životinja, koja je bila pod delovanjem gentamicina i verapamila, bila veća u odnosu na drugu grupu tretiranu samo gentamicinom. Koncentracija kalijuma je takođe bila manja u drugoj i trećoj grupi u poređenju sa kontrolnom grupom ali je pad koncentracije kalijuma bio statistički nesignifikantno izraženiji, uz uticaj gentamicina. Gubitak elektrolita urinom objašnjavamo disfunkcijom nefrona pod uticajem gentamicina, posebno lediranjem proksimalnih tubula čija je reapsorptivna sposobnost umanjena degeneracijom i značajnom deskvamacijom epitela. Promene na proksimalnim tubulima, kao i degenerativne promene na glomerulima, bile su u manjem stepenu izražene simultanim delovanjem i gentamicina i verapamila. Protektivnu ulogu verapamila u gentamicinskoj nefrotoksičnosti podupiremo manje izraženom redukcijom subkapsularnog prostora, samo mestimičnom nekrozom kapilarnih zidova, manje izraženim zastojem na kapilarima, redom pojavom hijalinih cilindara, kao i relativnom očuvanošću tubularnog sistema. Moguće je da su protektivni efekti verapamila vezani za vazodilataciju u području bubrega što ističu i Goldfarb i sar. (10), posebno ako u bubrežnoj slabosti postoji ishemija.

Literatura

1. Silverblatt FJ, Kuenh C. Auto radiography of Gentamicin uptake by the rat proximal tubule cells. *Kidney Int* 1984; 15:335-45.
2. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 29(3): 465-77.
3. 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.
4. Džogoeva FU, Kutyrina IM, Salbiev KD, Džogoeva ZU. Endothelin-1 in contrast media nephrotoxicity. Protective effects of calcium blockers. Abstracts, 37th Congress of the European Renal Association. Niče; 2000: 109.
5. Watson AJ, Gimenez LF, Klassen DK, Stout RL, Whelton A. Calcium channel blockade in experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J Clin Pharmacol* 1987; 27(8): 625-7.
6. Niemczyk S, Ludwicka A, Groniowski M, Lewandowski Z, Hasse Z, Wadyn KA. Nephrotoxicity of aminoglycosides. II Preventive studies with oral administration of verapamil. *Pol Arch Med Wewn* 1991; 85(1): 12-8.
7. Brashier MK, Geor RJ, Ames TR, O'Leary TP. Effect of intravenous calcium administration on gentamicin-induced nephrotoxicosis in ponies. *Am J Vet Res* 1998; 59(8): 1055-6.
8. Sokol PP, Huiatt KR, Holahan PD, Ross CR. Gentamicin and verapamil compete for a common transport in renal brush border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251(3): 937-42.
9. Perez de la Cruz MJ, Cardoniga R, Ochoa MC, Albaran I, Herrero-Vanrell R, Pastoriza P. Chronopharmacokinetics and calcium in the prevention of gentamicin-induced nephrotoxicity in rabbits. *Biopharm Drug Dispos* 1998; 19(6): 407-12.
10. 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 VERAPAMIL ON SODIUM AND POTASSIUM SERUM CONCENTRATION AND HE COLORING MORPHOLOGICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL GENTAMICIN NEPHROTOXICITY

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

The effects of verapamil on glomerular changes and tubular system in rats were analyzed in gentamicin nephrotoxicity. Epithel desquamation of proximal tubules and degenerative changes in glomerular was detected in animals treated by gentamicin (100 mg/kg body mass/24h). In animals, treated by gentamicin, the decreasing of sodium and potassium appeared in comparison to the control group. The combination of verapamil and gentamicin resulted in lower kidney damage than gentamicin itself, so the level of sodium concentration in serum and potassium concentration was higher in the third experimental group. Nephron morphological changes were lower by simultaneous treatment of gentamicin and verapamil. Consequently, the obtained results support hypothesis that verapamil is a protective factor in gentamicin nephrotoxicity. *Acta Medica Medianae* 2004; 43(2): 9-12

Key words: verapamil, protective factor, HE coloring, gentamicin nephrotoxicity