تأثیر جنتامایسین بر میزان آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز ادرار در کلیهٔ پرفیوز شدهٔ موش صحرایی

رعنا غزنوی * ، مهدیه فقیهی * ، مهری کدخدایی * ، صدیقه شمس **

خلاصه :

سابقه و هدف: با توجه به شیوع سمیت کلیوی جنتامایسین و عوارض شناخته شده آن و اهمیت اندازه گیری سمیت کلیوی، این تحقیق به منظور تعیین تاثیر جنتامایسین بر میزان رها شدن آنزیم‌های سلولی آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز ادرار، بر روی موشهای صحرایی انجام گرفت.

مواد و روشها: مطالعه از نوع تجربی بوده و تعداد شانزده عدد موش صحرایی نر (دو دسته مورد و شاهد ۸ تایی) مورد بررسی قرار گرفتند. در گروه شاهد پرفیوژن با بافر تیرود و در گروه مورد پرفیوژن با بافر تیرود همراه با جنتامایسین به عمل آمد. میزان فعالیت آنزیم‌های سلولی آلکالین فسفاتاز ولاکتات دهیدروژناز ادرار به عنوان شاخص‌های سمیت سلولی در زمانهای مختلف اندازه‌گیری و مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته ها: میزان فعالیت آنزیم‌ها در گروه مورد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار نشان داد ($P<0/01$) .

نتیجه گیری و توصیه‌ها: پرفیوژن جنتامایسین به کلیه‌ها موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های سلولی مذکور در ادرار می‌شود که می‌تواند به عنوان نشانگر اثر سمی جنتامایسین بر سلول‌های دیواره توبول‌های کلیوی باشد. از این رو، می‌توان الگوی مطالعه حاضر را جهت بررسی جوانب مختلف سمیت کلیوی جنتامایسین، همچنین به عنوان الگویی از نارسایی حاد کلیوی به کار برد.

مقدمه

در مطالعاتی که برروی بیش از ده هزار بیمار انجام گرفت، متوسط سمیت کلیوی جنتامایسین در افرادی که بیش از سه روز دارو دریافت کرده بودند، ۱۴ درصد گزارش شده است (۱). با توجه به میزان بالای سمیت کلیوی دارو، مطالعه بر روی این عارضه الزامی بود که برای انجام آن در مطالعات مختلف روش‌ها و الگوهای متنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعه با استفاده از الگوهای عضو مجزا، از آنجایی که تداخل اثر سایر اعضا در آن حذف می‌گردد و شرایط مطالعه کاملاً تحت نظر و کنترل پژوهشگر می‌باشد، بویژه در مطالعه بر روی مکانیسم پایهٔ پدیده‌های مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک، نتایج با ارزش و قابل اعتمادی به دست می‌دهد. در مطالعاتی که بر روی کلیه انجام می‌شود، روش‌های مختلف مجزا سازی صورت می‌پذیرد. مطالعه روی توبول، گلومرول، کلیهٔ کامل مجزا در حمام بافتی و کلیه کامل مجزای درجا(in situ) از آن جمله می‌باشد. در الگوی اخیر سیستم عروقی و توبولی کلیه دست نخورده بوده و به دلیل in situ بودن آن استرس کمتری در جریان مجزا سازی

* گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

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

به عضو وارد می‌شود. از این رو، در عین موجود بودن مزایای الگوی مجزا، نزدیکترین شرایط را به شکل بالینی دارا می‌باشد. حال اگر بتوان سمیت جنتامایسین را در این الگو ایجاد کرد، الگوی مناسبی جهت مطالعه بر روی سمیت کلیوی این دارو خواهیم داشت.

مطالعات نشان می‌دهد که جنتامایسین یک تجمع انتخابی در قشر کلیه دارد. جنتامایسین به دلیل کاتیونی بودن با تمایل بالایی به فسفولیپیدهای آنیونی موجود در دیوارهٔ آپیکال سلولهای توبولی، متصل می‌شود و این اتصال متابولیسم فسفا تیدیل اینوزیتول را دچار وقفه می‌سازد. اثر نهایی کاهش واکنش‌های وابسته به گیرنده‌های غشایی (که همبستگی و جامعیت سلول را کنترل می‌کنند)، صدمات سلولی و عدم کفایت جهت ترمیم سلولهای آسیب دیده می‌باشد (۱).

در مطالعه حاضر برای بررسی سمیت سلولی توبول‌های کلیوی از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز [Alkaline phosphatase(ALP)] و لاکتات دهیدروژناز [Lactate dehydrogenase(LDH)] استفاده شد.

به طور کلی یک آنزیم مناسب جهت بررسی آسیب‌های کلیوی باید فعالیت بالایی در پارانشیم کلیه داشته باشد ولی فعالیت آنزیم در مجاری ادراری پایین‌تر، خیلی کم یا صفر باشد. باتوجه به شرایط مذکور آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز نیز برای این منظور مناسب می‌باشند(۲). آلکالین فسفاتاز آنزیم غیر اختصاصی است که استرهای آروماتیک و آلیفاتیک را هیدرولیز می‌کند.

ALP به طور گسترده در تمام بافت‌ها تولید می‌شود. مقادیر بالای این آنزیم را می‌توان در توبول‌های کلیوی مشاهده کرد. ALP بوسیلهٔ لنگرهای گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول به غشا متصل می‌شود و به این ترتیب علامت شاخص غشای سلولی به حساب می‌آید. فعالیت ALP در ادرار به صورت طبیعی بسیار ناچیز است و فعالیت بالای آن در ادرار نشانگر آسیب به لبه برسی سلول‌های دیواره توبول پروگزیمال می‌باشد (۳).

لاکتات دهیدروژناز در تمام بافت‌ها تولید می‌شود و یک نقش کلیدی در متابولیسم انرژی دارد. میزان LDH در انفارکتوس، آسیب‌های هپاتوسلولی، کارسینوم ها و هر شرایطی که باعث نکروز سلولی شود، بالا می‌رود (۴).

فعالیت این آنزیم در اکثر بافت‌های بدن مشاهده می‌شود و حضور آن تنها در سیتوزول است. در برخی از بافت‌ها از جمله کبد، قلب، کلیه مقدار آن بسیار زیادتر از سرم است. بنابراین، کمترین صدمه وارده به بافت‌های مذکور می‌تواند به صورت قابل ملاحظه‌ای موجب افزایش مقدار این آنزیم در ادرار شود (۵).

LDH علامت شاخص سیتوزول بوده و بالا رفتن فعالیت آن در ادرار بیانگر صدمه دیدن سلول‌های دیواره توبول پروگزیمال است. (۶) از این رو، به منظور تعیین تاثیر تجویز جنتامایسین بر میزان ALP و LDH ادرار، این تحقیق روی کلیه پرفیوز شده موش صحرایی انجام گرفت.

مواد و روشها

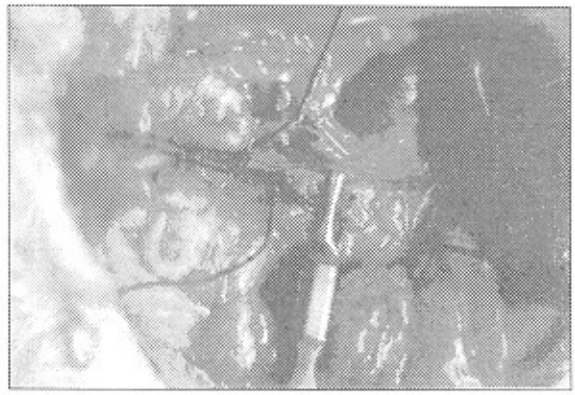
تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. در این مطالعه از ۱۶ موش صحرایی سفید نر با وزن ۲۱۰ تا ۲۴۰ گرم استفاده شد. موش‌ها در دو گروه هشت‌تایی به شرح زیر تقسیم گردیدند:

گروه شاهد ـ جریان محلول تیرود به کلیه‌ها برقرار شد و ادرار جمع‌آوری گردید.

گروه مورد ـ جریان محلول تیرود به کلیه‌ها برقرار شد. در دقیقهٔ ۳۰ تزریق جنتامایسین به کلیه با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در هر میلی لیتر (۷) آغاز و ادرار جمع‌آوری 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 جمع‌آوری گردید.

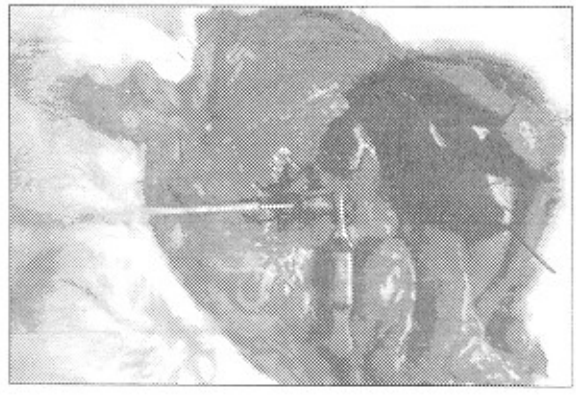
الگوی مورد استفاده در مطالعه حاضر، کلیه مجزای in situ است (۲،۸). هدف از جراحی در این الگو جایگزین

کردن جریان خون کلیه‌ها با یک محلول فیزیولوژیک است.
مراحل انجام کار به ترتیب زیر می‌باشد:
انشعابات آئورت شکمی به جز شریان‌های کلیوی شامل: شریان مزانتریک فوقانی، شریان‌های ایلیولومبار راست و چپ و شریان‌های اسپرماتیک داخلی مسدود می‌گردد (شکل ۱).



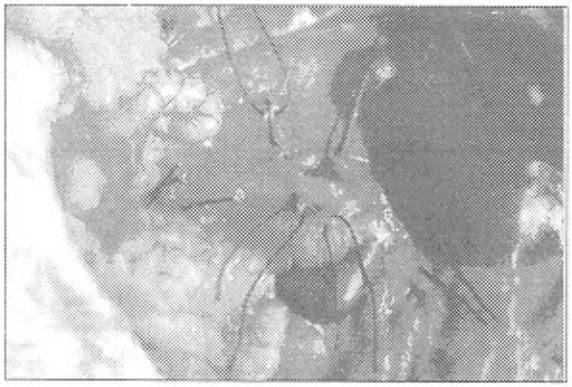
شکل ۱: شریان‌های منشعب از آئورت شکمی که در جریان پرفیوژن بسته می‌شوند

محدودهٔ انشعاب شریان‌های کلیوی از آئورت شکمی با رد کردن نخ از زیر آئورت دربالاتر و پایین‌تر از محل این انشعاب‌ها مشخص می‌شود (شکل ۲).



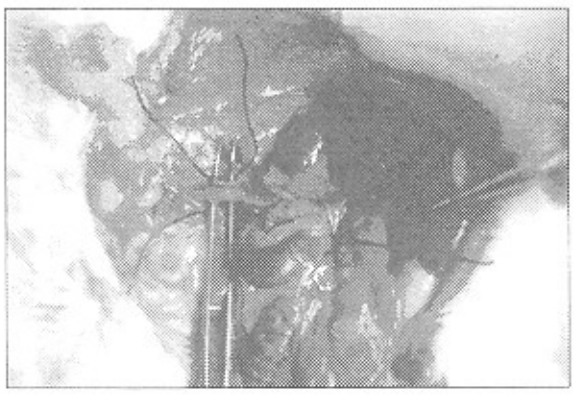
شکل ۲: مشخص کردن محدودهٔ انشعاب شریان‌های کلیوی از آئورت

سپس آئورت را در قسمت پایین‌تر از انشعاب شریان‌های کلیوی مسدود کرده، یک کلیپس درروی آئورت در بین محل انشعاب شریان‌های کلیوی و محل انسداد پایینی آئورت قرار می‌گیرد. جریان خون آئورت در بین کلیپس و محل انسداد قطع می‌شود ولی جریان خون کلیه‌ها همچنان برقرار است تا کلیه‌ها در طی کانول گذاری آئورت دچار ایسکمی نشوند (شکل۳).



شکل ۳: قراردادن کلیپس روی آئورت در بین محل انشعاب شریان‌های کلیوی و محل انسداد پایین آئورت

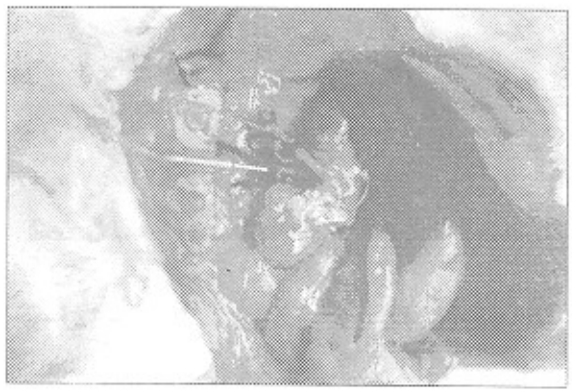
در این مرحله یک شکاف کوچک روی این بخش از آئورت ایجاد کرده و کانول (G23) به درون آئورت وارد می‌گردد (شکل ۴).



شکل ۴: قرار دادن کانول در آئورت

سپس آئورت در بالاتر از محل انشعاب شریان‌های کلیوی مسدود می‌گردد. بلافاصله کلیپس برداشته شده، هپارین از طریق یک سه‌راهی به میزان ۲۰۰ واحد به درون کانول تزریق می‌گردد و پمپ (PR: Shimadzo) روشن می‌شود تا پرفیوژن با جریان ۴ میلی‌لیتر در دقیقه برای هر کلیه آغاز گردد (۲،۹).

مرحله آخر طی چند ثانیه و با سرعت انجام می‌شود تا کلیه‌ها دچار هیپوکسی نگردند. پس از شروع پرفیوژن رنگ کلیه‌ها بتدریج روشن‌تر می‌گردد (شکل ۵).



شکل ۵: آغاز پرفیوژن و سفید شدن کلیه‌ها.

سپس میزنای‌ها از بافتهای پیوندی اطراف پاک شده، از انتهایی‌ترین قسمت اتصال یافته به مثانه توسط قیچی جدا می‌گردد. انتهای باز حالب‌ها در زمان‌های مورد نظر برای جمع آوری ادرار به طور جداگانه در داخل لوله‌های کوچک ۱/۵ میلی لیتری قرار می‌گیرند.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های LDH و ALP با اتوآنالیزور (مدل هیتاچی ۷۰۴) انجام گرفت.

به منظور مقایسه میانگین فعالیت آنزیم در گروه‌های مختلف، ارقام حاصل توسط نرم افزار SAS تحت آنالیز واریانس دوطرفه قرار گرفت. سپس با انجام آزمون نیومن - کولز بررسی آماری میزان اختلالات صورت گرفت.

یافته‌ها

تحقیق نشان داد تجویز جنتامایسین موجب افزایش میزان ALP و LDH در ادرار گردید و دوز و مدت زمان تجویز جنتامایسین برای ایجاد سمیت کلیوی کافی بوده است.

در مطالعه حاضر با وجود این که 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 رابطهٔ مستقیم بین میزان سمیت سلولی مورد انتظار و میزان فعالیت آنزیم‌ها در ادرار است.

از انجام آزمون‌های مذکور نتایج زیر حاصل شد:

میزان فعالیت آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و لاکتات دهیدروژناز در دقایق ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ در گروه مورد نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<0/01$). نتیجهٔ مذکور در جدول های (۱) و (۲) نمایش داده شده است.

جدول ۱ ـ میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ادرار در گروه شاهد و مورد به تفکیک زمانهای مورد بررسی

گروه	شاهد	مورد
زمانهای پی گیری		
دقیقه ۷۰	۲۸۰/۸ ±۵۰*	۶۸۶ ±۱۰۰
دقیقه ۹۰	۲۲۰ ±۶۴/۶	۶۰۰/۵ ± ۹۰
دقیقه ۱۱۰	۱۸۸ ±۳۵/۴	۲۴۰±۴۰/۵

* فعالیت آنزیم برحسب واحد در لیتر (U/lit) است

جدول ۲ ـ میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز ادرار در گروه شاهد و مورد به تفکیک زمانهای مورد بررسی

گروه	گروه شاهد	گروه مورد
زمان بررسی		
دقیقه ۷۰	۱۲۲/۵ ±۳۸*	۲۸۰ ±۵۰
دقیقه ۹۰	۹۰/۵ ±۱۲	۳۵۲ ± ۴۰
دقیقه ۱۱۰	۶۰ ±۱۵/۲	۲۰۸±۲۰

* فعالیت آنزیم برحسب واحد در لیتر (U/lit) است

بحث

تحقیق نشان داد که پرفیوژن جنتامایسین به کلیه‌ها، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های ALP و LDH ادراری نسبت به گروه شاهد گردید و دوز مدت زمان تجویز جنتامایسین برای ایجاد سمیت کلیوی کافی بود.

جنتامایسین به دلیل تداخل با متابولیسم فسفواینوزیتیدها موجب کاهش انتقال غشایی موادی می‌شود که همبستگی و جامعیت سلول را کنترل می‌کنند، و این به مرگ سلولی و عدم کفایت جهت ترمیم سلول‌های آسیب دیده منتهی می‌گردد. علاوه بر سمیت سلولی مستقیم، جنتامایسین با افزایش مقاومت عروق کلیوی موجب کاهش میزان تصفیه گلومرولی [Glomerular filtration rate= GFR] نیز می‌گردد(۱). به منظور بررسی سمیت کلیوی جنتامایسین شاخص‌های متعددی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در برخی پژوهش‌ها از اندازه‌گیری شاخص‌های مستقیم عملکرد کلیوی استفاده شده است. از جمله در مطالعهٔ Sumpio و همکاران (۱۰) و Nakakoki و همکاران (۱۱) به منظور پی گیری روند عملکرد کلیه و سمیت جنتامایسین شاخص هایی از قبیل GFR ، میزان جذب سدیم، کراتینین خون و میزان دفع آلبومین اندازه‌گیری شده‌اند (۱۱).

در مطالعات جدیدتر امکان استفاده از میزان فعالیت آنزیم‌های سلولی در ادرار (که در شرایط عملکرد طبیعی کلیه‌ها این میزان ناچیز می‌باشد) به عنوان شاخص‌های سمیت کلیوی مواد مختلف مطرح شده است. به نظر می‌رسد استفاده از این آنزیم‌ها نسبت به شاخص‌های مستقیم نارسایی کلیوی سهولت و حساسیت بیشتری دارد. در مطالعه Obtaomi و همکاران که برای بررسی سمیت کلیوی جنتامایسین به عمل آمده، میزان آنزیم‌های سلولی در ادرار پس از چند روز افزایش معنی داری نشان می‌دهد که حاکی از شروع سمیت جنتامایسین در این مدت می‌باشد (۱۲).

یک مطالعه توسط Schreiber و همکاران بر روی انسان انجام شده و در آن بیماران دارای آلتهاب روده که دچار نارسایی کلیوی شده‌اند از لحاظ عملکرد کلیوی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در این مطالعه، میزان ALP به عنوان یک شاخص حساس برای صدمات توبولی به کار برده شده است (۱۳). نتایج مطالعه حاضر با مطالعات به عمل آمده در این زمینه همخوانی دارد و ارزشمندی دو آنزیم ALP و LDH را به عنوان شاخص‌های سمیت کلیوی در مدل کامل مجزای in situ نیز تایید می‌کند.

در مطالعهٔ Cojocel و همکاران که بر روی کلیه مجزا در حمام بافتی آزمایش کرده‌اند نیز مانند مطالعهٔ حاضر دوز ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفته است (۷) ولی Sumpio و همکاران میزان ۰/۸ میلی گرم در میلی لیتر را به کار برده‌اند. به نظر می‌رسد چون از شاخص‌های مستقیم عملکرد کلیوی برای بررسی استفاده شده، از آن جایی که این شاخص‌ها نسبت به آنزیم‌های سلولی از حساسیت کمتری برخوردار هستند، برای ایجاد سمیت قابل سنجش باید دوز بالاتری از دارو تجویز شود (۱۰).

با توجه به اختصاصی‌تر بودن و ارزش علمی بالای یافته‌های حاصل از آزمایش بر روی بافت‌های مجزا، همچنین سهولت روش جراحی و اجرا و دسترسی آسان به مواد و تجهیزات لازم، الگوی مطالعهٔ حاضر جهت بررسی جوانب مختلف سمیت کلیوی جنتامایسین، همچنین به عنوان الگویی از نارسایی کلیوی بسیار مناسب می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نویسندگان از جناب آقای دکتر پرویز عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، به سبب تهیه عکس‌ها تشکر و قدردانی می‌نمایند. در ضمن، از همکاری صمیمانهٔ آقایان دکتر فتح اللهی و دکتر قادری و سرکار خانم بنا صادق از گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس سپاس گزاری به عمل می‌آورد.

منابع

1 - Duggin G. Drug nephrotoxicity. ***Ann Rev Pharmacol Toxicol*** 1988; 28 (3): 331 - 45.

۲ – علا شهرام، دهپور احمد رضا. بررسی اثر نیتروپک‌اکساید برسمیت کلیوی سرب در مدل کلیهٔ پرفیوز شده. پایان‌نامه دکتری داروسازی، تهران: دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۷۷، صفحه ۴۲-۲۰.

3 - Clemo FA. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. ***Toxicol Pathol*** 1998; 26(1): 29-32.

4 - Vasudevan D.M. Sreekumari S. ***Textbook of Biochemistry***. India: Jaypee Publisher: 1998; 54-58.

۵ – امیر رسولی هوشنگ. **بیوشیمی بالینی**. تهران: نشر جعفری، ۱۳۷۰، صفحات ۶۳-۷۵.

6 - Yu L, Gengaro PE, Niedeberger M. Nitric oxide a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. ***Proc Nat Acad Sci USA*** 1994; 91(5): 1691-5.

7 - Cojocel C, Hook JB. Effects of acute exposures to Gentamicin on renal handling of proteins. ***Toxicology*** 1983; 28 (4): 347-56.

8 - Fulton D, Balazy M, McGiff JC, Quilley J. Possible contribution of platelet cyclooxygenase to renal vascular action of 5,6-Epoxyeicosatrionic acid. ***J Pharmacol Exp Therup*** 1995; 277:1195- 199.

9 - Haynes J, Cooper M. Adrnomedulin and calcitonin gen related peptid in the rat isolated kidney and in the anaesthetised rat. ***Eur J Pharmacol*** 1995; 280(5): 91-4.

10 - Sumpio BE, chaudry IH, Baue AE. Reduction of the drug induced nephrotoxicity by ATP - $MgCl_2$, effects on Gentamicin treated isolated perfused kidneys. ***J Surg Res*** 1985; 38(5): 438 - 45.

11 - Nakakuki M, Yamasaki F, shinkawa T, Kudo M. Protective effect of human ulinastatin against Gentamicin - induced acute renal failure in rats. ***Can J Physiol Parmacol*** 1996; 74(1): 104-11.

12- Obatomi DK, Plummer DT. Renal damage caused by Gentamicin. ***Toxicol Lett*** 1995; 75-83.

13 - Schreber S, Hamling J, Zehnter E. Renal tubular dysfunction in patients with inflamatory bowel disease treated with Aminosalicylate. ***Gut*** 1997; 40(6): 761-6.