

بررسی رابطه بین مقادیر سمی جنتامایسین و فعالیت آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسن در

کلیه، ریه و سرم موش صحرائی

چکیده

آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسن (ACE) با اثر روی مولکول غیرفعال آنژیوتنسن I (AngI) آن را تبدیل به مولکول فعال آنژیوتنسن II (AngII) می‌نماید. بافتهای ایپی‌تلیومی، اندوتلیومی و نوروایپیلیالی منبع ACE هستند. این آنزیم در بافتهایی نظیر ریزپرزه‌های روده و توبولهای کلیه فراوان است و مقداری از آن نیز درون پلاسما شناور می‌باشد. در مواردی دیده شده است که استفاده از داروهای دارای سمیت ریوی یا کلیوی، توانسته است میزان سرمی و بافتی این آنزیم را تغییر دهد. در این مطالعه، اثر داروی دارای سمیت کلیوی (جنتامایسین) بر روی فعالیت ACE در موش صحرائی بررسی شده است. ۵ گروه از موشهای نر نژاد Sprague-Dawley انتخاب گردیدند که گروه اول گروه کنترل بود و به ۴ گروه بعدی هر روز ۱۰۰ mg/kg جنتامایسین داخل صفاقی داده شد. این ۴ گروه به ترتیب در روزهای ۱، ۲، ۵ و ۷ قربانی شدند و میزان فعالیت ACE در سرم و بافتهای کلیه و ریه این حیوانات اندازه‌گیری شد. برای مقایسه، فعالیت آنزیم NAG (آنزیم لیزوزومال و داخل سلولی) به عنوان استاندارد نشان‌دهنده آسیب سلولی در این بافتها و ادرار بررسی گردید. همچنین با اندازه‌گیری پارامترهای عملکرد کلیوی (کراتینین، اوره، سدیم و پروتئین ادرار)، اندازه‌گیری میزان جنتامایسین بافت کلیوی و مشاهدات بافت شناسی بافت کلیه‌ها، روند تغییرات اعمال شده بر کلیه‌ها بررسی گردید. فشار خون موشها توسط cuff دمی اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که مصرف مقادیر حاد جنتامایسین (۱۰۰ mg/kg) باعث آسیب پیشرونده کلیه‌ها می‌گردد. نشانه‌های نارسایی حاد کلیوی و آسیب سلولهای توبول کلیه عبارتند از: الف) کاهش کلیرانس کراتینین، افزایش BUN و پروتئینوری. ب) افزایش درجه آسیب بافتی در مطالعه پاتولوژی ج) افزایش فعالیت آنزیم NAG ادرار و کاهش NAG کلیه‌ها. میزان ACE بافت کلیه بطور معنی‌داری در روز اول کاهش یافت اما در مورد بافت ریه و سرم، این تغییرات تا روز هفتم مشاهده نگردید.

ACE ریه در روز هفتم افزایش معنی‌داری یافت که در همان زمان ACE سرم و کلیه نیز افزایش نشان داد. فشار خون در روز هفتم بطور معنی‌داری بالا رفت که با افزایش ACE ریوی همخوانی دارد. این اطلاعات نشان می‌دهد که احتمالاً افزایش فعالیت ACE کلیه حاصل آزاد شدن نیتریک اکسید (NO) از کلیه آسیب دیده می‌باشد. این اثر ناشی از یک پیام عمومی است که سبب افزایش ACE در بدن می‌شود و در نتیجه فشار خون و احتمالاً سرعت پالایش گلومرولی (GFR) افزایش می‌یابد.

کلیدواژه‌ها: ۱ - آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسن ۲ - جنتامایسین

۳ - فشار خون

۴ - موش صحرائی

این مقاله در قالب طرح پژوهشی به شماره ۲۸۱ در دفتر معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران به ثبت رسیده است.

(I) استادیار پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.

(II) استاد و مدیرگروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران (*مؤلف مسؤول)

(III) استادیار گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران.

مقدمه

ACE اثرات فیزیولوژیک آن در سیستم رنین - آنژیوتانسین خوبی شناخته شده است. در این سیستم ACE آنژیوتانسین I را تبدیل به آنژیوتانسین II می‌کند که ماده اخیر یک منقبض کننده قوی عروقی می‌باشد. ACE با تحریک ترشح آلدوسترون از کورتکس آدرنال باعث احتباس یون سدیم می‌گردد. همچنین موجب بی اثر شدن ماده گشاد کننده عروق یعنی برادی کینین می‌شود. این اثر دوگانه ACE در نگهداری فشار خون و هموستاز آب و الکترولیتها سبب شده است که مهار ACE جایگاه موفقی در درمان هیپرتانسیون و نارسایی احتقانی قلب داشته باشد (۱).

آنزیم تبدیل کننده آنژیوتانسین (ACE) در ۳ گونه سلولی (اندوتلیال، اپی تلیال و نوروپی تلیال) یافت می‌شود (۲). همچنین در پلاسما شناسایی و از آن جدا گردیده است (۳) که در پلاسما ریشه اندوتلیالی داشته و در بسیاری از بسترهای عروقی وجود دارد (۴).

ACE در سلولهای اپی تلیال کلیه و روده کوچک نیز یافت شده است (۵ و ۶) که در روده کوچک انسان مقادیر فراوانی از ACE بر روی ریز پرزها وجود دارد (۷). همچنین در ساختمانهای ریز پرز دیگر از جمله جفت و شبکه کورویئید (۸) نیز حضور دارد.

بیشترین فعالیت آنزیمی ACE در بافتهایی نظیر اندوتلیوم عروقی و اپی تلیوم توبولهای پروکسیمال کلیه است.

آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی مصرف گسترده‌ای در درمان عفونتهای گرم منفی دارند. با این حال مصرف این داروها علیرغم پایش میزان سرمی دارو و حفظ آن در محدوده غیر سمی در ۱۰٪ افراد توام با سمیت حاد کلیوی است (۹).

باکتریهای گرم منفی و جنتامایسین اثر سینرژسم روی سمیت کلیوی دارند که این اثر حاصل اندوتوکسین باکتریها و افزایش باز جذب جنتامایسین در کلیه‌ها می‌باشد (۱۰).

سمیت کلیوی جنتامایسین به علت تجمع انتخابی آن در قشر کلیه‌ها است (۱۱ و ۱۲) و به دنبال آن نارسایی حاد کلیوی بروز می‌کند. جنتامایسین بیشتر قسمت ابتدایی توبولهای خمیده پروکسیمال را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۳). عملکرد بد توبولهای پروکسیمال مشخصه اصلی سمیت کلیوی با آمینوگلیکوزیدها است که ضایعات مورفولوژیک ناشی از آن با میکروسکوپ نوری دیده شده است (۱۴ و ۱۵).

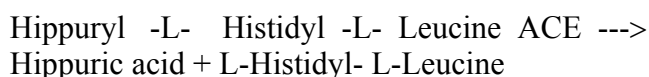
آنتی بیوتیکهای آمینوگلیکوزیدی همچنین باعث اختلال در عملکرد لیزوزومها در سلولهای توبول پروکسیمال کلیه پستانداران می‌شوند که مشخصه آن انبساط لیزوزومها همراه با تجمع بیش از حد اجسام میلوئید است (۱۶، ۱۷ و ۱۸). انباشته شدن لیزوزومها باعث مرگ سلول می‌شود که این امر به دلیل تغییرات مکانیکی و یا شیمیایی غشای لیزوزومها یا به علت نقصان عملکرد لیزوزوم است. از نظر بیوشیمی کاهش فعالیت کاتپسین B، اسفنگو میلیناز (۱۹)، فسفولیپاز (۲۰)، افزایش ترشح ادراری آنزیمها از جمله NAG (۲۱) و افزایش میزان فسفولیپید غشای کلیه (۲۲) مشاهده شده است.

در رابطه با سمیت کلیوی نتایج مطالعات انسانی ناقص و محدود است (۲۳ و ۲۴). یکی از علل وجود گزارشات ضد و نقیض در این رابطه، حساسیت محدود افزایش کراتینین سرم که معمول ترین نشانه نفروتوکسیسیته آمینوگلیکوزیدها است، می‌باشد. تغییرات وسیع سلولهای توبول پروکسیمال خیلی قبل از تغییرات کراتینین اتفاق می‌افتد (۲۵).

تعیین میزان فعالیت NAG در تشخیص مسمومیتها از جمله سمیت کلیوی، آسیب بافتها و اندامها دارای اهمیت می‌باشد (۲۶). فعالیت این آنزیم در ادرار ترشح شده از کلیه‌هایی که آسیب دیده‌اند (به هر علت) افزایش می‌یابد. لیزوزومهای آسیب دیده در سلولهای توبول کلیه منبع مناسب NAG ادرار هستند.

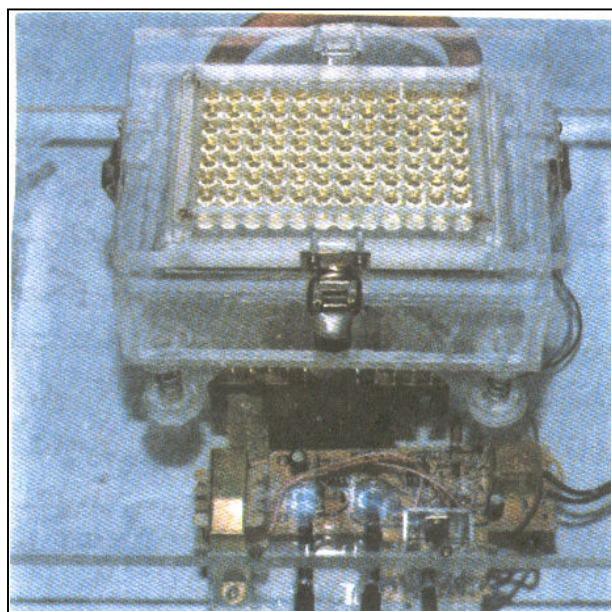
بطوری که اشاره شد آنزیم ACE در لایه‌های اپی تلیوم و اندوتلیوم فراوان است و به صورت آنزیم غشایی به

- اندازه‌گیری فعالیت ACE: فعالیت ACE با استفاده از سوبسترای هیپوریل - ال - هیس‌تیدیل - ال - لوسین و بوسیله دستگاه HPLC بر اساس روش شرح داده شده (۲۸ و ۲۹)، با تغییراتی برای انجام واکنش در شرایط میکرو سنجیده شد. واکنش آنزیمی طبق معادله زیر صورت گرفت.



برای انکوباسیون آنزیم و سوبسترا، ابتدا ۱۰ میکرولیتر از سرم یا بافت هموژنیزه درون چاهکهای میکروپلیت ریخته شد، سپس ۴۰ میکرولیتر بافر حاوی سوبسترا به آن اضافه گردید.

هنگام اضافه کردن سوبسترا با استفاده از کرنومتر زمان اندازه‌گیری می‌شد و بعد از خاتمه زمان انکوباسیون (معمولاً ۳۰ دقیقه)، ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ۳٪ اسید متاسفریک به عنوان متوقف کننده واکنش به آن اضافه می‌گردید. برای انکوباسیون میکروپلیت از دستگاه لرزاننده میکروپلیت که در گروه ساخته شده بود استفاده گردید (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱ - دستگاه حمام و لرزاننده میکروپلیت برای انکوباسیون واکنش آنزیم و سوبسترا

خارج از سطح سلول متصل است (۲۷). هدف از این تحقیق بررسی اثر داروی دارای سمیت کلیوی (جنتامایسین) بر میزان ACE در موشهای صحرایی بود، با این فرض که این بافت سرشار از آنزیم ACE می‌باشد و تغییرات سمی در این ناحیه باعث تغییر در میزان ACE می‌گردد.

هدف دیگر در این مطالعه بررسی تغییرات فشار خون در اثر مصرف این دارو بوده است، زیرا ACE باعث افزایش فشار خون می‌شود و اگر مصرف این دارو باعث تغییر ACE شود بنابر این تغییر فشار خون را نیز انتظار داریم.

روش بررسی

- جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه ۵ گروه موش صحرایی نر از نژاد Sprague - Dawley در محدوده وزنی ۲۰۰ الی ۲۵۰ گرم انتخاب شدند.

G0 یا همان گروه کنترل دارای ۱۰ عدد موش صحرایی و گروههای بعدی (G1, G2, G3, G4) هر کدام دارای ۸ موش صحرایی بودند که به ترتیب در روزهای ۱، ۲، ۵ و ۷ قربانی شدند. تمام موشها هر روز در ساعت ۹ صبح ۱۰۰ mg/kg جنتامایسین داخل صفاقی دریافت کرده بودند (گروه کنترل به همان حجم نرمال سالین دریافت کرد).

ابتدا موش صحرایی با تزریق داخل صفاقی ۰/۶ ml/۱۰۰ g از محلول اورتان ۲۵٪ بیهوش و فشار خون اندازه‌گیری شد سپس توسط سرنگ بطور مستقیم از قلب حیوان خون‌گیری انجام گردید.

پس از لخته شدن خون، سرم بوسیله سانتریفوژ جدا و نمونه‌های سرم درون فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

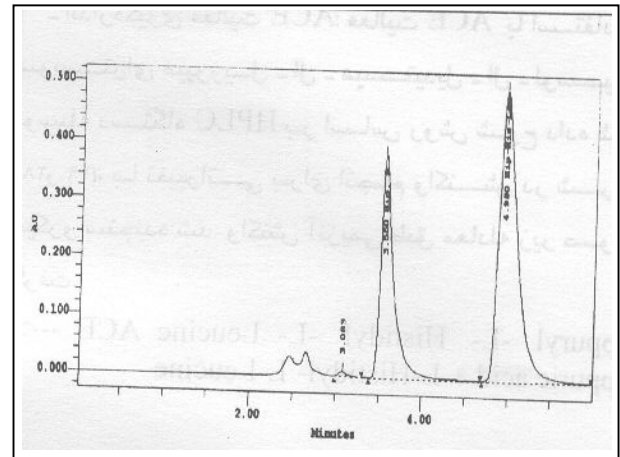
پس از این مرحله، قفسه سینه و محوطه شکمی حیوان باز شد و قلب، ریه‌ها، آئورت و کلیه‌ها خارج و هموژن گردیدند.

به منظور اندازه‌گیری میزان آنزیم NAG، کراتینین، سدیم و پتاسیم ادرار، ۲۴ ساعت قبل از قربانی شدن، موشها درون قفسه‌های متابولیک که به این منظور در گروه فارماکولوژی طراحی و ساخته شده بود قرار گرفتند.

p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine NAG
 ----> *p*-Nitrophenol + N-acetyl- β -D- glucosamine

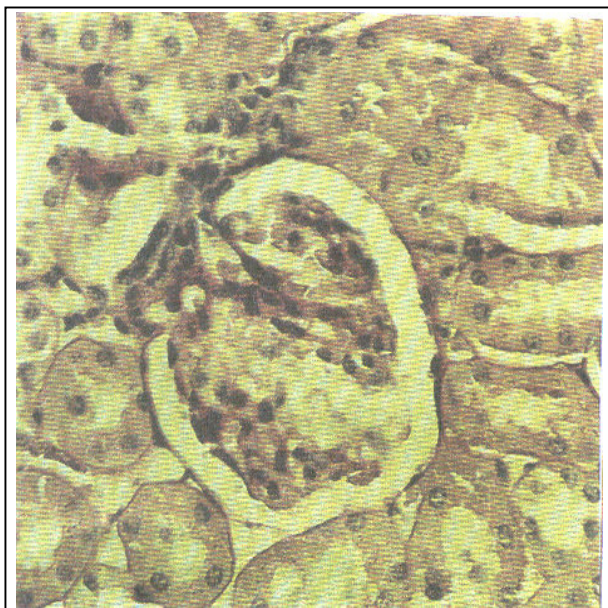
با تغییراتی در این روش، تعیین مقدار واکنش آنزیمی به مقیاس میکرو برده شد و انکوباسیون بوسیله دستگاه لغزنده حمام میکروپلیت صورت گرفت که ۵۰ میکرولیتر از نمونه درون چاهکهای میکروپلیت ریخته شد. نمونه‌های کلیه و ریه قبلاً ۱۰ مرتبه با بافر انکوباسیون رقیق شده بودند. با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر سوبسترا واکنش آغاز گردید. بعد از خاتمه زمان انکوباسیون، ۲۰۰ میکرولیتر بافر متوقف کننده روی آن اضافه شد. از دستگاه ELIZA reader برای اندازه‌گیری محصول (پارانیتروفنل) استفاده گردید. برای تعیین فعالیت آنزیم، تفاوت جذب چاهکهای تست و بلانک در معادله خط منحنی استاندارد قرار داده شد و غلظت محصول از آن بدست آمد. ۱ واحد فعالیت آنزیم NAG عبارت است از مقدار آنزیمی که در مدت ۱ دقیقه در دمای 37°C یک نانومول پارانیتروفنل تولید نماید. فشار خون موشها با استفاده از cuff دمی و بوسیله ترانسدیوسر پنوماتیک بر روی فیزیوگراف ثبت می‌شد (۳۱). اندازه‌گیری کراتینین به روش ژافه انجام شد (۳۲). اندازه‌گیری اوره با کیت تجاری شرکت پارس آزمون و بر اساس روش Berthelot بود (۳۲). تعیین میزان جنتامایسین موجود در مایع هموژنیزه بافت کلیه توسط آزمایشگاه رفرانس بیمارستان بوعلی تهران و با استفاده از سیستم TDX انجام شد. میزان جنتامایسین بر حسب ng/g "وزن تر" بافت کلیه گزارش گردید. سدیم و پتاسیم سرم و ادرار با استفاده از دستگاه Flame photometer اندازه‌گیری شد. پروتئینهای ادرار به روش سولفوسالیسیلیک اسید اندازه‌گیری شدند (۳۳). میزان FES (کسر ترشحاتی سدیم) و RFI (اندیس نارسایی کلیه) با استفاده از فرمولهای زیر محاسبه گردید:

$$\%FES = \left(\frac{\text{کراتینین ادرار} \times \text{سدیم سرم}}{\text{کراتینین سرم}} \right) \times 100$$



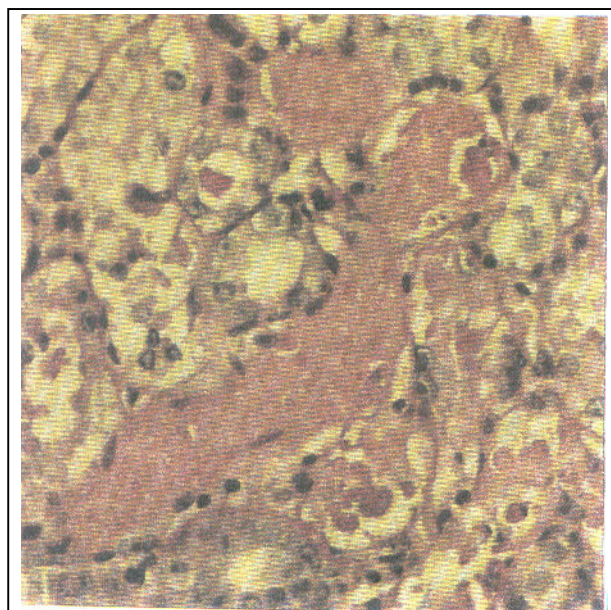
نمودار شماره ۲- کروماتوگرام محصول و سوبسترای تجزیه نشده انکوباسیون ACE، پیک اسیدهیپوریک (محصول) در طول موج ۲۲۸ نانومتر با زمان نگهداری حدود ۳/۵۵ دقیقه بخوبی از پیک سوبسترای تجزیه نشده با زمان نگهداری ۴/۹۵ دقیقه تفکیک شده و کل زمان کروماتوگرام نیز کوتاه است.

دستگاه HPLC مورد استفاده متعلق به شرکت Waters و ستون مورد استفاده $\mu\text{Bondapak}^{\text{C}}_{18}$ با قطر ذرات ۱۰ میکرون بود. ۲۰ میکرولیتر از محلول انکوباسیون به دستگاه تزریق شد (هر نمونه ۲ بار تزریق می‌شد). فاز متحرک (مخلوط ۱:۱ از KH_2PO_4 ۱۰ میلی مولار و متانول با $\text{PH} = 3$ که با صافی غشایی ۰/۴۵ میکرون صاف شده بود) با سرعت ۱ میلی لیتر در دقیقه جریان داشت و کل زمان کروماتوگرام ۶ دقیقه بود و پیکها در طول موج ۲۲۸ نانومتر و $\text{Aufs} = 1$ ردیابی می‌شدند. کروماتوگرام در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. برای تعیین فعالیت آنزیم، تفاوت سطح زیر منحنی تست و بلانک را در معادله خط منحنی استاندارد قرار داده و غلظت محصول (اسید هیپوریک) را از آن به دست آوردیم. طبق تعریف ۱ واحد فعالیت آنزیم، مقدار آنزیمی است که بتواند در مدت ۱ دقیقه در دمای 37°C ، یک میکرومول اسید هیپوریک تولید نماید. - اندازه‌گیری فعالیت NAG: اندازه‌گیری فعالیت NAG با استفاده از سوبسترای پارانیتروفنل - ان - استیل - بتا - د - گلوکز آمین و به روش اسپکتروفوتومتری انجام شد (۳۰). طبق واکنش زیر محصول واکنش پارانیتروفنل بود که در طول موج ۴۱۰ نانومتر جذب دارد.



الف

شکل شماره ۴ - تصاویر میکروسکوپ نوری از بافت‌های کلیه موش‌های G0 و G4 که رنگ‌آمیزی PAS شده‌اند. عکس (الف) گلوبول و توپول نرمال و عکس (ب) توپول دچار نکروز و دارای cast (توده‌های ارغوانی) را نشان می‌دهد. (بزرگنمایی 100x، 400x)



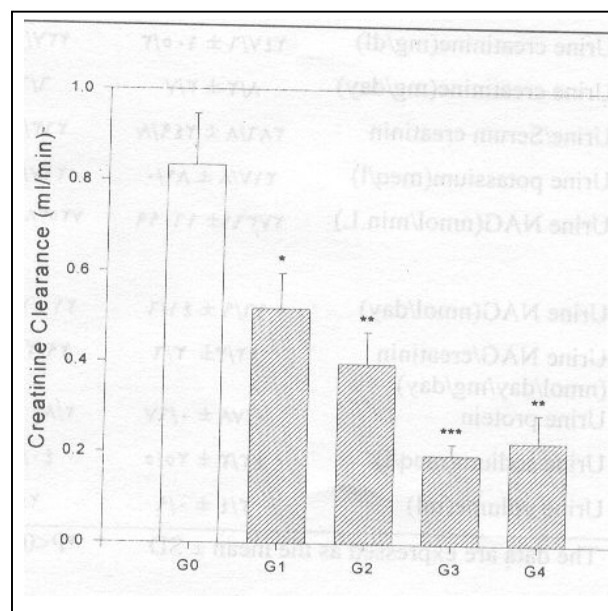
ب

(الف) کاهش کلیرانس کراتینین (نمودار شماره ۳ و جدول شماره ۱)، (ب) پروتئینوری (جدول شماره ۱)، (ج) افزایش BUN (جدول شماره ۱)، (د) افزایش میزان FES و RFI (جدول شماره ۱)، (ه) پیل‌آوری (جدول شماره ۱).

کراتینین ادرار / کراتینین = (میلی اکی والان در لیتر) RFI
 سرم × سدیم ادرار
 - مطالعات هیستوپاتولوژی: برای انجام این مطالعه نیمی از کلیه راست موش‌ها بعد از کشتن، داخل محلول فرمالدئید ۱۰٪ قرار داده شد و بعد از تهیه لام و رنگ‌آمیزی PAS (Periodic acid shiff) و هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) میزان آسیب بافتی براساس وجود معیارهای زیر از صفر تا ۳ امتیاز تعیین گردید. لازم به ذکر است که بررسی به صورت blind انجام گرفت. معیارها به قرار زیر بودند: ۰ = فقدان ضایعه، ۱ = نکروز خفیف موضعی، ۲ = نکروز منتشر همراه با اتساع توپولها، ۳ = نکروز شدید همراه با رسوبات (casts) در لومن توپولها. محاسبات آماری این مجموعه بوسیله نرم افزارهای Sigma plot® و SPSS انجام شد.

نتایج

- شواهد حاکی از بروز نارسایی حاد کلیوی: مصرف جمعی دوزهای ۱۰۰ mg/kg جنتامایسین به دلایل زیر باعث آسیب کلیه‌ها می‌شود.



نمودار شماره ۳ - کلیرانس کراتینین برحسب میلی لیتر در دقیقه در موش‌های G0 (ستون خالی) و موش‌های G1 الی G4 (ستون‌های هاشور خورده). ستونها نمایانگر میانگین هر گروه بوده و خطای معیار بر روی آن نمایش داده شده است. ($P < 0.05$, $***P < 0.001$, $**P < 0.01$)

جدول شماره ۱- خلاصه تغییرات مشاهده شده در اثر تزریق دوزهای ۱۰۰mg/kg جنتامایسین به موشهای صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley در روزهای ۱، ۳، ۷ (G1-G4) و مقایسه آن با موشهای کنترل (G0)

	G0	G1	G2	G3	G4
Blood pressure(mmHg) ¹	۸۳/۶ ± ۳۰/۴	-	۸۷/۸ ± ۳/۰	-	۱۱۲/۷ ± ۶/۹*
BUN(mg/dl)	۲۴/۶ ± ۳/۱	۴۵/۰ ± ۷/۹***	۳۵/۸ ± ۶/۴***	۳۰/۰ ± ۷/۵	۸۰/۸ ± ۳۸/۱***
BUN/Creatinin	۳۹/۲ ± ۱۵/۴	۵۴/۶ ± ۱۹/۱	۲۳/۱ ± ۷/۸*	۲۳/۵ ± ۷/۱*	۲۴/۹ ± ۸/۸*
Creatinin clearance (ml/min)	۰/۸۳ ± ۰/۳۴	۰/۵۲ ± ۰/۲۲*	۰/۴۰ ± ۰/۲۰**	۰/۲۰ ± ۰/۰۶***	۰/۲۳ ± ۰/۱۴**
FES	۰/۰۸ ± ۰/۰۵	۰/۰۷ ± ۰/۰۲	۰/۶۱ ± ۰/۳۲**	۰/۰۹ ± ۰/۰۵	۰/۷۸ ± ۰/۵۷**
Kidney gentamicin(ng/g)	۰/۰۰	۴۷/۵ ± ۱۶/۶	۲۰۴/۵ ± ۱۲۹/۴	۱۲۶/۸ ± ۷۳/۴	۸۲/۰ ± ۴۵/۱
Kidney ACE (μmol/min.g)	۰/۲۷ ± ۰/۰۷	۰/۱۷ ± ۰/۰۵**	۰/۱۹ ± ۰/۰۴**	۰/۱۸ ± ۰/۰۴**	۰/۲۴ ± ۰/۰۷
Kidney NAG (nmol/min.g)	۲۴۵۱ ± ۷۹۸	۱۷۱۶ ± ۱۰۲۸	۱۵۸۳ ± ۷۱۵*	۸۳۴ ± ۸۳.**	۸۰۸ ± ۶۰۲***
Lung ACE(μmol/min.g)	۵/۵ ± ۰/۷	۵/۴ ± ۱/۳	۵/۶ ± ۰/۹	۵/۲ ± ۱/۷	۷/۸ ± ۱/۷**
Lung NAG(nmol/min.g)	۶۸۱ ± ۴۹۸	۵۹۰ ± ۳۶۸	۷۱۲ ± ۳۰۴	۶۰۸ ± ۲۲۸	۶۱۳ ± ۱۹۳
Pathologic changes	۰/۰۰	۱/۰۰ ± ۰/۵۴	۱/۷۵ ± ۰/۴۶	۱/۸۶ ± ۰/۹۰	۲/۵۷ ± ۰/۵۴
RFI	۰/۱۴ ± ۰/۱۰	۰/۱۷ ± ۰/۱۴	۰/۸۵ ± ۰/۵۰***	۰/۲۱ ± ۰/۱۱	۱/۰۳ ± ۱/۰۶*
Serum ACE (μmol/min.L)	۱۷۳/۶ ± ۳۶/۴	۱۷۹/۸ ± ۴۱/۰۰	۱۵۳/۱ ± ۱۹/۳	۱۹۸/۵ ± ۶۲/۸	۱۹۸/۲ ± ۵۳/۴
Serum creatinin(mg/dl)	۰/۷۴ ± ۰/۳۳	۱/۰۳ ± ۰/۴۷	۱/۷۰ ± ۰/۶۰***	۱/۳۵ ± ۰/۳۹**	۳/۵۲ ± ۱/۸۱***
SerumNAG(nmol/min.L)	۱۲۶۵۱ ± ۷۳۴۶	۱۱۲۸۳ ± ۷۹۳۶	۱۳۳۰۳ ± ۷۹۱۲	۱۰۳۹۹ ± ۶۳۸۲	۱۲۴۸۹ ± ۶۲۱۲
Serum sodium(meq/l)	۱۶۸/۹ ± ۱۷/۳	۱۵۸/۷ ± ۹/۹	۱۶۳/۰ ± ۱۷/۰	۱۹۳/۶ ± ۱۲/۸*	± ۱۱/۴۹*** ۲۱۳/۰
Serum urea(mg/dl)	۵۸/۸ ± ۱۹/۸	۹۶/۴ ± ۱۷/۰***	۷۶/۷ ± ۱۳/۷*	۶۴/۲ ± ۱۶/۰	۱۷۲/۸ ± ۸۱/۶***
Urine creatinine(mg/dl)	۲۴۷/۶ ± ۱۰۵/۳	۲۳۷/۰ ± ۴۸/۸	۳۱۱/۳ ± ۱۵۰/۵	۱۲۸/۲ ± ۵۷/۴*	۱۴۸/۸ ± ۱۰۶/۶*
Urine creatinine(mg/day)	۸/۲ ± ۳/۷	۶/۶ ± ۱/۸	۸/۶ ± ۲/۶	۳/۸ ± ۰/۹**	۸/۰ ± ۲/۵
Urine/Serum creatinin	۳۸۶/۸ ± ۲۴۹/۸	۲۶۳/۵ ± ۹۴/۴	۲۰۱/۴ ± ۸۹/۳	۹۴/۱ ± ۴۱/۳**	۵۰/۷ ± ۳۳/۹**
Urine potassium(meq/l)	۲۱۷/۸ ± ۸۱/۰	۲۱۷/۰ ± ۴۰/۲	۲۳۱/۰ ± ۷۵/۷	۱۵۷/۳ ± ۸۳/۵	۱۹۸/۷ ± ۹۱/۶
Urine NAG(nmol/min.L)	۲۷۳۶۱ ± ۱۶۰۹۹	۷۲۵۲۸ ± ۴۰۷۰**	± ۲۸۹۶۲*** ۸۷۰۶۹	± ۳۴۸۰۳** ۶۳۵۷۸	± ۲۲۲۳۳.** ۲۴۳۱۱۹
Urine NAG(nmol/day)	۹۶/۹ ± ۴۱/۶	۲۱۰/۱ ± ۱۲۹/۵*	۲۶۳/۴ ± ۱۲۵/۶**	۱۶۲/۹ ± ۵۷/۹*	۱۱۶۵ ± ۸۱۳/۷**
Urine NAG/creatinin (nmol/day/mg/day)	۱۲/۳ ± ۳/۶	۲۹/۲ ± ۱۲/۲**	۳۱/۷ ± ۱۵/۶**	۴۳/۵ ± ۱۳/۲***	۱۳۷/۵ ± ۶۳/۲***
Urine protein	۰/۷۸ ± ۰/۶۷	۲/۸۸ ± ۱/۱۳***	۲/۵۰ ± ۰/۷۶***	۲/۰۰ ± ۰/۸۹**	۴/۱۷ ± ۰/۷۵***
Urine sodium(meq/l)	۴۳/۳ ± ۲۵/۵	۴۰/۹ ± ۲۰/۵	۱۴۶/۰ ± ۵۲/۷***	۲۰/۸ ± ۱۳/۰	۳۰/۳ ± ۱۴/۵
Urine volume(ml)	۳/۴ ± ۰/۹	۲/۹ ± ۰/۷	۳/۰ ± ۱/۲	۳/۶ ± ۱/۸	۷/۷ ± ۳/۴**

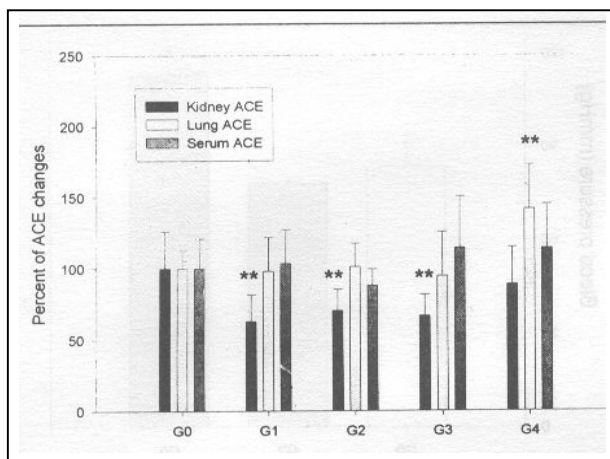
¹ The data are expressed as the mean ± SD *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

blind انجام شد. طبق شکل‌های شماره ۴، نمودار شماره ۵ و جدول شماره ۱ میزان تخریب پیش‌رونده است.

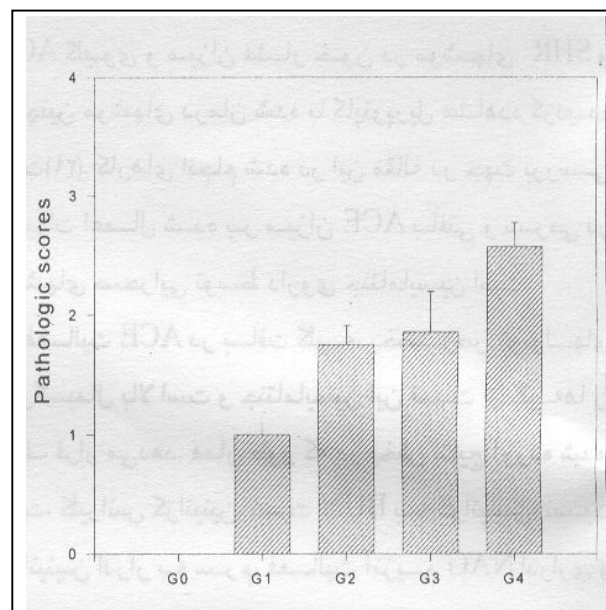
(۲) بررسی افزایش آنزیم NAG در داخل ادرار و به تناسب کاهش این آنزیم لیزوزومی در داخل بافت

به منظور اثبات نکروز سلول‌های بافت توبولی از ۲ روش استفاده گردید:

(۱) مطالعات پاتولوژیک بافت کلیه که توسط پاتولوژیست پروژه و براساس درجه‌بندی میزان آسیب بافتی، به روش



شکل شماره ۷- فعالیت ACE در نمونه‌های هموژنیزه شده بافت کلیه (ستون‌های سیاه)، بافت ریه (ستون‌های خاکستری) و نمونه‌های سرم (ستون هاشور خورده) بر حسب درصد تغییر نسبت به کنترل (۱۰۰٪) در موشهای G0 الی G4. ستونها نمایانگر میانگین هر گروه بوده و خطای معیار بر روی آن نمایش داده شده است.



نمودار شماره ۵- تغییرات هیستوپاتولوژی در لامهای تهیه شده از موشهای G0 الی G4 که بر اساس معیارهای تشریح شده امتیازبندی شده‌اند. ستونها نمایانگر میانگین هر گروه بوده و خطای معیار بر روی آن نمایش داده شده است.

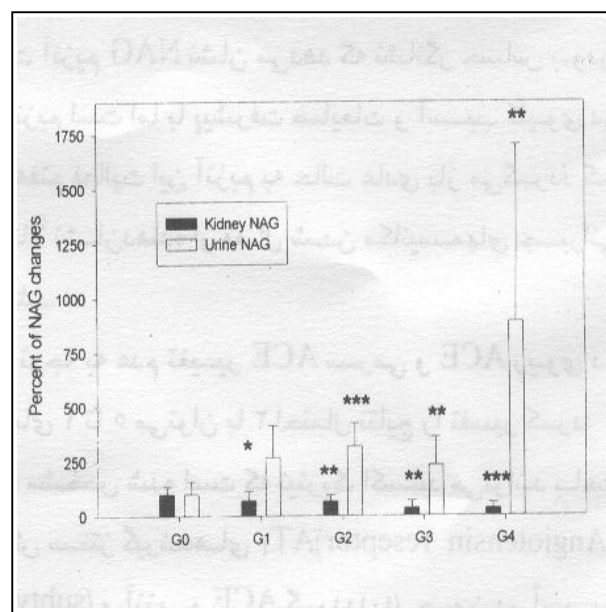
کلیه (شکل شماره ۶ و جدول شماره ۱) که نشانگر لیز سلولی و آزاد شدن لیزوزومها می‌باشد.

- بررسی فعالیت آنزیم ACE بافتی و سرمی: براساس اندازه‌گیریهایی که انجام شد، فعالیت ACE بافت کلیه بلافاصله در روز اول کاهش معنی‌داری یافته بود که تا روز هفتم ادامه داشت (شکل شماره ۷ و جدول شماره ۱). میزان فعالیت ACE ریوی فقط در روز هفتم افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود اما ACE سرم تغییر معنی‌داری نداشت. افزایش فعالیت ACE ریوی با افزایش معنی‌دار فشار خون سیستمیک همراه بود (نمودار شماره ۸، جدول شماره ۱).

بحث

ACE یک اکتوانزیم است که هر دو جایگاه فعال آن در خارج سلول قرار دارد. آنزیم توسط یک لنگر آبگریز که در انتهای کربوکسی آن قرار گرفته به غشای سلولی متصل می‌گردد (۳۴).

ACE محلول در پلاسما فعال بوده و محلول بودن این آنزیم حاصل قطع و گسست لنگر آبگریز مولکول ACE بافتی است (۳۵).



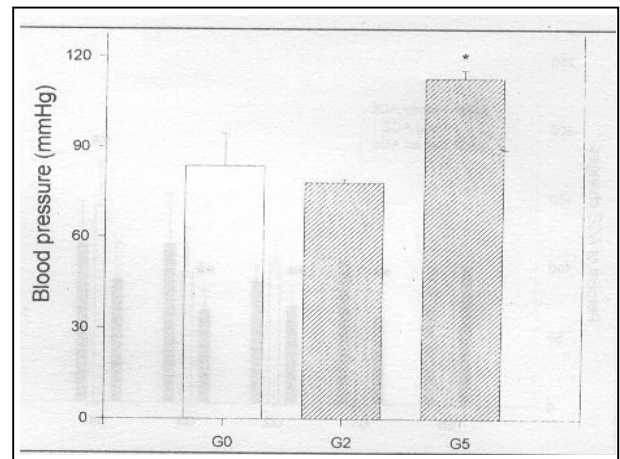
نمودار شماره ۶- فعالیت آنزیم NAG در نمونه‌های هموژنیزه شده بافت کلیه (ستون‌های سیاه) و ادرار (ستون‌های خاکستری) بر حسب درصد تغییر نسبت به کنترل (۱۰۰٪) در موشهای G0 الی G4. ستونها نمایانگر میانگین هر گروه بوده و خطای معیار بر روس آن نمایش داده شده است. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

گلوپروولها است. با این حال رابطه‌ای بین میزان فعالیت ACE کلیوی و میزان فشار خون در موشهای SHR و همچنین موشهای درمان شده با کاپتوپریل مشاهده گردیده است (۳۹). کارهای انجام شده در این مقاله در جهت بررسی تغییرات اعمال شده بر میزان ACE بافتی و سرمی در موشهای صحرایی توسط داروی جنتامایسین است.

فعالیت ACE در بافت کلیه، بخصوص توبولهای پروکسیمال بالا است و جنتامایسین این قسمت از کلیه‌ها را هدف قرار می‌دهد. همان طور که در بخش نتایج آورده شده است، کلیرانس کراتینین، نسبت BUN به کراتینین، نسبت کراتینین ادرار به سرم، فعالیت آنزیم NAG ادراری و کلیوی، میزان پروتئینوری و مشاهدات بافت شناسی همگی تأیید کننده آسیب پیشرونده بافت کلیه هستند و ثابت می‌کنند که با مصرف روزانه جنتامایسین داخل صفاقی به میزان ۱۰۰ mg/kg، تخریب بافتی سیری صعودی و پیشرونده را طی می‌کند. فعالیت ACE در بافت کلیه در روز اول کاهش معنی‌داری را قبل از تغییرات معنی‌دار کراتینین و فعالیت آنزیم NAG نشان می‌دهد که نشانگر حساس بودن این آنزیم است اما با پیشرفت ضایعات و آسیب کلیوی در روز هفتم فعالیت این آنزیم به حالت عادی باز می‌گردد که احتمالاً نشان‌دهنده از فعال شدن مکانیسمهای جبرانی می‌باشد.

با توجه به عدم تغییر ACE سرمی و ACE ریوی در روزهای ۱ تا ۵ می‌توان با ۲ احتمال نتایج را تفسیر کرد: (۱) مشخص شده است که نیتریک اکسید می‌تواند باعث

کاهش سنتز گیرنده‌های AT_1 (Angiotensin reseptor) subtype I و آنزیم ACE گردد (۴۰). چون در آسیب توبولی ناشی از جنتامایسین تولید NO در بافت کلیه آغاز می‌گردد (۴۱-۴۴)، بنابراین به نظر می‌رسد که به دنبال آسیب توبولی ناشی از جنتامایسین، میزان نیتریک اکسید در محیط افزایش یافته و این امر منجر به کاهش سنتز ACE و آنژیوتانسین II بافتی می‌شود که کاهش ACE کلیوی در این صورت قابل توجیه است. می‌دانیم که سیستم رنین - آنژیوتانسین با تولید آنژیوتانسین II و آلدوسترون به



نمودار شماره ۸- فشار خون موشهای G0 (ستون خالی) و G2 و G4 (ستون‌های هاشور خورده) بر حسب میلی‌متر جیوه. ستونها نمایانگر میانگین هر گروه بوده و خطای معیار بر روی آن نمایش داده شده است ($P < 0.05$)*

نوع محلول ACE که در جریان خون وجود دارد نسبتاً فراوان بوده و غلظتی حدود 10^{-9} مولار دارد اما باید به خاطر داشت که نوع محلول آنزیم اهمیت فیزیولوژیک کمتری داشته و آنچه که مهم است آنزیم متصل به غشای اندوتلیال است (۳۶ و ۳۷).

تفاوت میزان ACE در بین افراد خیلی زیاد بوده و میزان آن در محدوده ۱ تا ۶ برابر متغیر است. با این حال میزان ACE در یک فرد در اندازه‌گیریهای مکرر تغییری را نشان نمی‌دهد و ثابت است (۳۶ و ۳۷). هیچ رابطه و همبستگی بین هورمون‌ها و پارامترهای محیطی نتوانسته است میزان تغییرات زیاد بین افراد را بیان کند (۲۷ و ۳۸).

البته بررسیهای ما نشان داد که میزان ACE رابطه معنی‌داری با مصرف سیگار دارد و میزان ACE سرمی در افراد سیگاری بطور معنی‌داری پایین‌تر از جمعیت طبیعی است (۳۸).

ACE درون کلیه روی سلولهای حاشیه مسواکی توبولهای پروکسیمال تغلیظ می‌شود و نقش ACE توبولی در فیزیولوژی کلیه هنوز ناشناخته است.

جایگاه فعال آنزیم به سوی لومن توبولی قرار گرفته و احتمالاً نقش آن هیدرولیز پپتیدهای فیلتره شده از طریق

عملکرد و متابولیسم کلیه‌ها می‌شود. با توجه به تغییرات ACE در کلیه در می‌یابیم که تغییرات ACE با آسیب بافتی و یا میزان جنتامایسین رابطه خطی ندارد.

در تأیید این مطلب در مطالعه‌ای در موش‌های صحرایی (۱۶)، جنتامایسین با دوز ۵۰ mg/kg به مدت ۸ روز تزریق گردید. فعالیت آنزیم γ -گلو تامیل ترانسپیتیداز که آنزیم حاشیه مسواکی است بطور معنی‌داری کاهش یافت.

نکته جالب اینکه این اثر با دوز ۴ mg/kg و بمدت ۸ روز مشاهده شد و افزایش دوز اثر بیشتری نداشت (۱۶). علاوه بر γ -گلو تامیل ترانسپیتیداز، فعالیت آنزیم آلانین آمینوپیتیداز نیز که آنزیم حاشیه مسواکی است کاهش یافت. همزمان با این کاهش، فعالیت ادراری این آنزیمها افزایش پیدا کرد (۱۶).

معنی دار بودن این تغییرات در مسمومیت با جنتامایسین واضح نبود، زیرا این اثرات وابسته به دوز نبودند. در نهایت تغییر چشمگیری در میزان پروتئین بافتی حاصل نگردید (۱۶).

متأسفانه به دلایل تکنیکی و وجود موارد مداخله گر موفق به اندازه‌گیری آنزیم ACE ادرار نشدیم، در نتیجه نتوانستیم همراه با کاهش ACE کلیوی، افزایش ACE ادراری را مشاهده کنیم.

در مطالعه مذکور (۱۶) کراتینین خون از روز ۴ بالا رفت و ۱۵ روز بعد از خاتمه درمان به حد طبیعی خود بازگشت. معاینات بافتی نواحی بزرگی از نکرور را در قشر کلیه نشان داد.

در این مطالعه نیز مشابه یافته‌های ما میزان جنتامایسین بافتی تا روز چهارم یعنی روزی که کراتینین شروع به بالا رفتن نمود بطور خطی افزایش یافت و از آن به بعد در سطح ثابتی قرار گرفت.

دلیل این امر این است که هنگام نکروزه شدن سلولها، جنتامایسین داخل لیزوزومها آزاد می‌شود و در قسمتهای دیگر بطور غیر اختصاصی باز جذب می‌گردد. این اشباع ظاهری جذب جنتامایسین ممکن است بازتاب یک تعادل

ترتیب باعث بازجذب سدیم از توبولهای پروکسیمال و دیستال می‌گردد و در نتیجه سدیم ادرار کاهش می‌یابد (۵). بنابراین کاهش ACE در بافت کلیه منجر به افزایش FES می‌شود که این امر در روز سوم بخوبی قابل مشاهده است (جدول شماره ۱).

احتمالاً در ادامه با افزایش دفع سدیم، سیستم رنین - آنژیوتانسین بافتی فعال شده و دفع سدیم کاهش می‌یابد که این مسئله در روز پنجم قابل مشاهده است (جدول شماره ۱). از سوی دیگر به علت افزایش پلی اوری در روز هفتم، موشها دچار افزایش غلظت شده بودند که در نتیجه موجب افزایش میزان سدیم خون گردیده بود. ثابت شده است که در نکرور حاد توبولی باز جذب توبولی سدیم مختل شده و FES افزایش می‌یابد (۴۶) که به ترتیب در روزهای ۳ و ۷ شاهد این افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل بودیم (جدول شماره ۱).

از آنجائیکه محل آسیب جنتامایسین توبولهای پروکسیمال است و این آنزیم در این قسمت تغلیظ می‌شود (۷، ۸، ۱۳)، بنابراین آسیب این قسمت باعث ریزش این آنزیم به درون توبولها و ادرار می‌گردد. در تأیید این مطلب در مطالعه‌ای دیگر (۴۹)، جنتامایسین با مقدار روزانه ۱۰۰ mg/kg از طریق داخل صفاقی تا ۶ روز به موشهای نر نژاد Sprague-Dawley تزریق گردید. آمینوپیتیداز N کورتکس کلیه به میزان معنی‌داری در روزهای ۳ و ۶ کاهش یافت و آنژیوتانسیناز A نیز بعد از ۳ روز کاهش معنی‌داری پیدا کرده بود و بعد از ۶ روز کاهش بیشتری را نشان داد. همچنین دی‌پیتیدیل‌پیتیداز IV بعد از ۶ روز کاهش معنی‌داری را نشان داد. نتایج این مقاله نشان داد که تجویز طولانی مدت جنتامایسین در دوزهای بالا باعث ازوتمی و کاهش فعالیت اکتوپیتیدازهای کلیه می‌شود.

این اکتوآنزیمها در حالت طبیعی پپتیدهای وازوکتیو و دیگر پپتیدهایی را که احتمالاً در تنظیم رشد و تمایز سلولی موثر هستند، بی‌اثر می‌سازند (۴۹). به دنبال اثر جنتامایسین و در نتیجه کاهش اکتوپیتیدازها، عملکرد پپتیدهای وازوکتیو و دیگر پپتیدها به مخاطره افتاده و باعث تغییر

با بررسی روی موشهای ACE.2 که فاقد ACE ریوی بودند و فقط ACE سرمی تولید می‌کردند، مشاهده گردید که این موشها دچار فشار خون بسیار پایینی هستند (۵۱).

بنابراین با توجه به اهمیت نقش ACE اندوتلیومی در کنترل فشار خون نسبت به ACE سرمی (۵۱)، با افزایش ACE ریوی شاهد افزایش فشار خون هستیم. با مطالعه‌ای که توسط ما بر روی افراد سالم و بدون فشار خون بالا انجام شده بود، مشاهده گردید که رابطه اندک اما معنی‌داری بین میانگین فشار خون و فعالیت ACE سرمی وجود دارد (۵۲) و احتمالاً آنچه که در فشار خون از اهمیت بیشتری برخوردار است ACE ریوی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

قسمتی از هزینه‌های این پروژه از محل طرح تحقیقاتی شماره ۲۸۱ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران تامین گردیده است که بدین وسیله از ریاست محترم و پرسنل آن معاونت قدردانی می‌گردد. همچنین نویسندگان این مقاله از مرکز تحقیقات مرکز علوم پایه دانشگاه علوم پزشکی ایران و آزمایشگاه فرانس بیمارستان بوعلی کمال تشکر را دارند.

منابع

- 1- Edwards C. R. W., and Padfield P. L. Angiotensin converting Enzyme Inhibitors: Past, present and bright future. *Lancet* 1985, 1(8419): 30-34.
- 2- Letizia C., Picarelli A., De Ciocchis A., et al., Angiotensin-converting enzyme activity in stools of healthy subjects and patients with celiac disease. *Digest. Dis. Sci.* 1996, 41:2268-2271.
- 3- Stewart T. A., Weare J. A., and Erdos E. G. Purification and characterization of human converting enzyme (kininase II). *Peptides* 1981, 2:145-152.
- 4- Campbell D. J. The site of angiotensin production. *J. Hypertens.* 1985, 3:199-207
- 5- Takada Y., Hiwada K., and Kokubu T. Isolation and characterization of angiotensin

پیچیده بین کاهش باز جذب به خاطر کاهش فیلتراسیون گلومرولی و دفع جنتامایسین از کلیه‌ها به خاطر حذف سلولهای نکروز یافته باشد (۱۶).

در مورد افزایش ACE ریوی (به عنوان مهمترین منبع ACE بدن) در روز هفتم و همزمانی آن با افزایش فشار خون، احتمالاً مکانیسمهای جبرانی دخیل بوده و افزایش فشار خون همزمان با آن در جهت جبران افت فیلتراسیون گلومرولی است.

با نگاه به فعالیت ACE کلیوی و سرمی نیز شاهد افزایش فعالیت آنزیم در روز هفتم بودیم که احتمالاً در اثر ظهور ماده‌ای به عنوان تحریک کننده سنتز این آنزیم در سراسر بدن است.

با مراجعه به فعالیت آنزیم NAG در ریه‌ها و سرم و عدم تغییر فعالیت آنها در این ۲ قسمت می‌توان اظهار کرد که آسیبی به ریه‌ها وارد نشده است و افزایش فعالیت ACE ریه‌ها در جهت افزایش فشار خون و جبران افت فیلتراسیون گلومرولی است.

در تحقیقی دیگر نیز مشاهده شد که (۱۹) مصرف همزمان پریندوپریل و جنتامایسین باعث تشدید اثرات سمی جنتامایسین روی کلیه‌ها شده است. یعنی مهار ACE با کاهش فشارخون باعث بدتر شدن اختلال در فیلتراسیون گلومرولی می‌شود.

در مطالعه‌ای دیگر (۵۰)، اثرات جنتامایسین و سیکلوسپورین A روی فعالیت ACE بررسی شد. سیکلوسپورین A باعث افزایش فعالیت ACE سرم و ریه و کاهش ACE کلیه‌ها شده بود.

در موشهایی که در معرض جنتامایسین قرار گرفته بودند، فقط افزایش فعالیت ACE ریه مشاهده شد (مشابه یافته‌های ما).

این محققین پیشنهاد کردند که افزایش ACE درپلاسما و ریه با تسهیل متابولیسم کینینهای شل کننده عروق ممکن است نقشی در اثرات فشار خونی سیکلوسپورین A داشته باشند اما هیچ اشاره‌ای به تغییرات فشار خون به دنبال مصرف جنتامایسین نکردند.

- 17- De Broe M. E., Paulus G. J., Verpooten G. A., et al., Early effects of gentamicin, tobramycin, and amikacin on the human kidney. *Kidney Int.* 1984, 25:643-652.
- 18- Olier B., Morin J. P., Grancher G., et al., Regenerating tubular cell process in rat kidney: influence of gentamicin treatment. *Int. J. Tiss. React.* 1987, 9:241.
- 19- Morin J. P., Thomas N., Toutain H., et al., Modulation of gentamicin nephrotoxicity by chronic inhibition of angiotensin I-converting enzyme in rat. *Arch. Toxicol.* 1989, 63:47-53.
- 20- Carlier M. B., Laurent P., Claes P. J., et al., Inhibition of lysosomal phospholipases by aminoglycoside antibiotics: in vitro comparative studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983, 23: 440.
- 21- Plummer D. T., Noorazar S., and Haslam J. D. The effect of gentamicin and coenzyme on the excretion of enzymes and ions in rat urine. In: Fillastre J. P. editor. *Nephrotoxicity ototoxicity of drugs. Colloque INSERM, Universite de Rouen.* 1982, PP:178-194.
- 22- Kaloyanides G. J., and Pastoriza-Munoz E. Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1980, 18:571.
- 23- Smith C. R., Lipsky J. J., Laskin O. L., Double blind comparison of the nephrotoxicity and auditory toxicity of gentamicin and tobramycin. *N. Engl. J. Med.* 1980, 302:1106-1109.
- 24- Fong I. W., Fenton R. S., and Bird R. Comparative toxicity of gentamicin versus tobramycin: a randomized prospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* 1981, 7:81-88.
- 25- Venkatachalam M. A. Pathology of acute renal failure, In: Brenner B. M., and Stein J. R., editor. *Contemporary Issues in Nephrology, Acute Renal Failure.* New York, Churchill Livingstone. 1980, PP: 79-107.
- 26- Marchewka Z., Kuzniar J., Lembas-Bogaczyk J., et al., N-acetyl-B-D-glucosaminidase isoenzymes in the diagnosis of poisoning and kidney disease. *Int. Urol. Nephrol.* 1994, 26:229-236.
- 27- Costerousse O., Jaspard E., Wei L., et al., The angiotensin I-converting enzyme (Kininase II): molecular organisation and regulation of its expression in humans. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 1992, (Suppl. 9), 20:S10-S15.
- converting enzyme from human kidney. *J. Biochem.* 1981, 90:1309-1319.
- 6- Ward P. E., Sheridan M. A., Hammon K. J., et al., Angiotensin I converting enzyme (kininase II) of the brush border of human and swine intestine. *Biochem. Pharmacol.* 1981, 29:1525-1529.
- 7- Picarelli A., Greco M., Di Giovanbattista F., et al., Quantitative determination of fecal fat, nitrogen and water by means of a spectrophotometric technique: Near infrared reflectance analysis (NIRA). Assessment of its accuracy and reproducibility compared with chemical methods. *Clin. Chim. Acta* 1995, 234:147-156.
- 8- Johnson A. R., Skidgel R. A., Gafford J. T. et al., Enzymes in placental microvilli: Angiotensin I converting enzyme, angiotensinase A, carboxipeptidase and neutral endopeptidase ("enkephalinase"). *Peptides* 1984, 5:789-796.
- 9- Shuler C. L., and Bennett W. M. Nephropathies caused by drugs, chemicals or physical agents. 1. Antimicrobial nephrotoxicity. In: Massry S. G., Glasscock . editors. *textbook of nephrology.* Baltimore, Williams & Wilkins. 1995, PP: 930-935.
- 10- Zager R. A. , and Prior R. B. Gentamicin and gram-negative bacteremia. A Synergism for the development of experimental nephrotoxic acute renal failure. *J Clin Invest.* 1986, 78:196-204.
- 11- Alfthan O., Renkonen O. V., and Sivonen A. Concentration of gentamicin in serum, urine and urogenital tissue in man. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B)*1973, (Suppl 241) 81:92.
- 12- Luft F. C., and Kleit S. A. Renal parenchymal accumulation of aminoglycoside antibiotics in rats. *J. Infct. Dis.* 1974, 130:656.
- 13- Luft F. C., Patel V., Yum M. N., et al., Experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 1975, 86:213-220.
- 14- Abramowics M., and Edelman C. M. Nephrotoxicity of anti-infective drugs. *Clin. Pediatr.* 1968, 7:389.
- 15- Falco F. g., Smith H. M., and Acieri G. M. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin. *J. Infect. Dis.* 1969, 119:406-409.
- 16- Morin J. P., Viotte G., Vandewalle A., et al., Gentamicin-induced nephrotoxicity: A cell biology approach. *Kidney Int.* 1980, 18:583-590.

healthy Iranian population: relationship to paraclinical parameters and cigarette smoking. *Res. Commun. Alcoh. Subst. Abuse*. 1999, 20:99-111.

39- Ikemoto F., Song G., Tominaga M., et al., Angiotensin converting enzyme in the rat kidney activity, distribution and response to angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nephron* 1990, (Suppl I) 55:3-9.

40- Adam A., and Rajj L. Nitric oxide angiotensin II axis in renal and cardiovascular injury. *J. Nephrol*. 2000, 13:211-220.

41- Rivas-Cabagero L., Rodriguez-Lopez A. M., Martinez-Salgado C., et al., Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Exp. Nephrol*. 1997, 5:23-30

42- Rivas-Cabagero L., Montero A., Lopez-Novoa J. M. Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin- induced renal failure. *Eur. J. Pharmacol*. 1994, 270:119-121.

43- Can C., Sen S., Boztok N., et al., Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *Eur. J. Pharmacol*. 2000, 390:327-34.

44- Rivas-Cabagero L., Rodriguez-Barbero A., Arevalo M., et al., Effect of NG-nitro-L- arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. *Nephron* 1995, 71:203-207.

45- Badr K. F., Ichikawa I., Prerenal failure: A deleterious shift from renal compensation to decompensation. *N. Eng. J. Med*. 1998, 319:623-629.

46- Kribben A., Edelstein C. L., Schrier R. W. Pathophysiology of acute renal failure. *J. Nephrol*. 1999, 12 (suppl 2) S142-S151.

47- Caldwell P. R. B., Seegal B. C., and Hsu K. C. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 1976, 191:1050-1051.

48- Hall E. R., Kato J., and Erdos E. G. Angiotensin I-converting enzyme in the nephron. *Life Sci*. 1976, 18:1299-1304.

49- Stefanovic V., Vlahovic P., Savic V., et al., Kidney ectopeptidases in gentamicin and mercuric chloride-induced acute renal failure. *Cell Physiol. Biochem*. 1998, 8:278-284.

50- Erman A., Chen-Gal B., Zabludowski J., et al., Cyclosporin A treatment enhances angiotensin converting enzyme activity in lung

28- Horiuchi M., Fujimura K., Trashima T., et al., Method for determination of angiotensin-converting enzyme activity in blood and tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr*. 1982, 233:123-130.

29- Schnaith E., Beyrau R., Buckner B., et al., Optimized determination of angiotensin I-converting enzyme activity with hippuryl-L-histidyl-L-leucine as substrate. *Clin. Chim. Acta* 1994, 227:145-158.

30- Horak E., Hopfer S. M., and Sunderman F. W. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl- γ -D-glucosaminidase activity. *Clin. Chem*. 1981, 27:1180-1185.

31- Mirkhani H., Omrani G. R., Ghiaee S., et al., Effects of mebudipine and dibudipine, two new calcium channel blockers, on rat left atrium, rat blood pressure and human internal mammary artery. *J. Pharm. Pharmacol*. 1999, 51:617-622.

32- Whelton A., Watson A. J., and Rock R. C. Nitrogen metabolites and renal function. In: Burtis C.A., and Ashwood E. R. editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed, Philadelphia. W.B. Saunders Co. 1994, PP:1528-1539.

33- Silverman L. M., and Christenson R. H. Amino acids and proteins. In: Burtis C. A., and Ashwood E. R. editors. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2nd ed. Philadelphia. W. B. Saunders Co. 1994, PP: 719-726.

34- Corvol P., Williams T. A., and Soubrier F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods. Enzymol*. 1995, 248:283-305.

35- Beldent V., Michaud A., Wei L., et al., Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of cleavage site. *J. Biol. Chem*. 1993, 268:26428-26434.

36- Alhenc-Gelas F., Weare J. A., Johnson R. L., et al., Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J. Lab. Clin. Med*. 1983, 101:83-96.

37- Alhenc-Gelas F., Richard J., Courbon D., et al., Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme in healthy men. Relationship to environmental and hormonal parameters. *J. Lab. Clin. Med*. 1991, 117:33-39.

38- Ziai S. A., Sadeghian T., Soltani-Arabshahi S. K., et al., Determination of angiotensin converting enzyme (ACE) activity in

and serum of rats. *J.Pharm . Pharmacol.* 1990, 42: 525-527.

51- Krege J. H., John S. W. M., Langenbach L. L., et al., Male-female differences in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. *Nature (Lond.)*. 1995, 375:146-148.

52- Ziai S. A., Seyedhosseini D., Taiebi L., et al., Correlation between ACE activity and mean blood pressure in healthy normotensive subjects after oral administration of a single dose of enalapril.. *Acta Physiol. Hungrica*. In press 2000, 87: 153-159.

STUDY OF RELATION SHIP BETWEEN TOXICITY OF GENTAMICIN AND ACTIVITY OF SERUM AND TISSUE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME IN RAT

^I S. A. Ziai, Ph.D ^{II} *M. Mahmoudian, Ph.D ^{III} P. Salehian, MD

ABSTRACT

Angiotensin I-converting enzyme (ACE) converts the inactive angiotensin I molecule to the active angiotensin II. ACE is abundant in epithelium, endothelium and neuroepithelial cells so it found largely on the brush border of intestine and kidney proximal tubules. ACE also presents in the serum. Some pulmonary and renal toxic drugs change the serum and tissue ACE contents.

In this study changes in ACE activity was studied in gentamicin induced renal failure of rats. Rats were sacrificed 1, 3, 5 and 7 days after intraperitoneal injection of 100 mg/kg of Gentamicin and ACE activity was measured in serum, kidney and lung. These data were compared with vehicle-treated rats. Rats with acute renal failure had proteinuria, polyuria, and decreased creatinin clearance. The damage to the proximal tubule of kidney was evident by (a) the histological analysis at light microscopy and (b) the augmentation in the urinary excretion of NAG. (N-acetyl β -D-glucosaminidase) Kidney ACE activity significantly decreased and lung and serum ACE activity didn't change until 7 th day. Then lung ACE activity increased significantly at 7 th day as well as kidney and serum ACE activity. Blood pressure increased significantly on the 7 th day correspond with the increment in lung ACE activity. These data support the idea that kidney ACE activity decrease are due to local nitric oxide release in damaged kidney, and this effect reversed by an universal signal which increase ACE contents in the body probably to increase systemic blood pressure and subsequently increase glomerular filtration rate (GFR).

Key Words: 1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 2) Blood pressure 3) Gentamicin 4)Rat.

This article is recorded in undersecretary of research of Iran University of Medical Sciences and Health Services (No:281)

I) Ph.D, Assistant professor of Reaserch center of Medical planets, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

II) Ph.D, Professor of farmacology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (*Corresponding author)

III) Assistant professor of pathology, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.