

ŽIURKĖ – GYVŪNO MODELIS, KOREGUOJANT NEFROTOKSIŠKUMĄ, SUKELTĄ GENTAMICINO

Judita Žymantienė¹, Rasa Želvytė¹, Vaidas Oberauskas¹, Gintaras Daunoras², Alius Pockevičius³, Juozas Jokimas², Jonas Milius⁴, Romaldas Mačiulaitis⁵

¹Anatomijos ir fiziologijos katedra, Veterinarijos akademija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas tel.(8-37) 36 32 04; el. paštas: juditaz@lva.lt

²Neužkrečiamųjų ligų katedra, Veterinarijos akademija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Tilžės g. 18, Kaunas

³Užkrečiamųjų ligų katedra, Veterinarijos akademija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Tilžės g. 18, Kaunas

⁴Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedra, Veterinarijos akademija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
Tilžės g. 18, Kaunas

⁵Teorinės ir klinikinės farmakologijos katedra, Medicinos akademija, Lietuvos sveikatos mokslų universitetas
A. Mickevičiaus g. 9, Kaunas

Santrauka. Gentamicinas (GM), plačiai vartojamas medicinoje ir veterinarinėje medicinoje, turi ir šalutinį poveikį. Darbo tikslas – ištirti GM terapinės ir didelės toksinės dozės įtaką Wistar žiurkių patinų svoriui, elgsenai, inkstų struktūrai ir natrio, kalio bei fosforo kiekio kaitai kraujyje ir šlapime, koreguojant gyvūno modelį nefrotoksiškumui tirti. Tirta 12 suaugusių Wistar žiurkių patinų, kurių svoris buvo 300–400 gramų. Gyvūnai laikyti individualiai metaboliuose narvuose („Techniplast“, Italija). I grupės žiurkėms (kontrolė) švirkšta į pilvo ertmę (*i. p.*) 1,5 ml (0,9 proc. NaCl) fiziologinio tirpalo 14 dienų kasdien. II grupės žiurkėms buvo švirkščiamas GM 5 mg/kg svorio (*i. p.*) 14 dienų kasdien, o III grupės – 80 mg/kg svorio (*i. p.*) 7 dienas iš eilės. II grupės žiurkių svoris per bandomąjį laikotarpį sumažėjo 8,00 proc., o III – 15,11 proc. palyginti su kontrole. Remiantis vienfaktorine dispersine analize, didelė GM toksinė dozė turėjo neigiamos įtakos žiurkių elgsenai: domėjimuisi aplinka – 99,50 proc. ($p < 0,001$), galvos padėties kitimui – 96,50 proc. ($p < 0,01$), tupėjimo pozai bei uodegos laikymui – 98,90 proc. ($p < 0,001$), nugaros išlenkimui, rietimuisi, gūžimuisi – 88,90 proc. ($p < 0,05$), netipiškam galvos laikymui – 100,0 proc. ($p < 0,001$), kailio valymui – 98,60 proc. ($p < 0,001$), kitoms etogramos elgesio pozicijoms – 55,10 proc. ($p < 0,05$). 80 mg/kg (*i. p.*) injekcijos GM sumažino Na, K ir padidino P kiekį Wistar žiurkių serume. Veikiama GM žiurkių organizme pakito Na, K ir P apykaita. Nustatytas neigiamas GM 80 mg/kg (*i. p.*) poveikis švirkščiant 7 dienas iš eilės inkstų histologinei struktūrai, pasireiškė distalinių ir proksimalinių kanalėlių nekrozė, jie prisipildė deskvamuotų ir degeneravusių ląstelių, išplito inkstų uždegimas. Taigi žiurkė gali būti naudojama kaip gyvūno modelis nefrotoksiškumui tirti, kai gentamicino švirkščiamas 80 mg/kg svorio (*i. p.*) 7 dienas iš eilės.

Raktažodžiai: žiurkė, GM, elgesys, serumas, šlapimas, inkstai, histologinis tyrimas.

RAT – AN ANIMAL'S MODEL FOR CORRECTION OF NEPHROTOXICITY USING GENTAMICIN

Judita Žymantienė¹, Rasa Želvytė¹, Vaidas Oberauskas¹, Gintaras Daunoras², Alius Pockevičius³, Juozas Jokimas², Jonas Milius⁴, Romaldas Mačiulaitis⁵

¹Department of Anatomy and Physiology, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania. Tel. +370 37 363204; e-mail: juditaz@lva.lt

²Department of Non-infectious diseases, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės g. 18, Kaunas, Lithuania

³Department of Infectious diseases, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės g. 18, Kaunas, Lithuania

⁴Department of Food Safety and Animal Hygiene, Veterinary Academy, Lithuanian University of Health Sciences
Tilžės g. 18, Kaunas, Lithuania

⁵Department of Theoretical and Clinical Pharmacology, Medical Academy
Lithuanian University of Health Sciences, A. Mickevičiaus str., 9, LT-44307, Kaunas, Lithuania

Summary. Nowadays, gentamicin (GM) is using widely for treatment of various diseases in medicine and veterinary medicine. However, GM have a side effect. Aim of study was to determine effect of therapeutic and maximal toxic doses of GM on the Wistar rat's male weight, behavior positions, structure of kidney, sodium, potassium and phosphorus value in urine and sera for correction of an animal model for investigation nephrotoxicity. Twelve adult Wistar rats weighing 300–400 g were housed in individual metabolic “Techniplast” cages (Italy) under controlled environmental conditions. Group 1 (control) was injected intraperitoneally (*i. p.*) with saline (0.5 ml of 0.9 % sodium chloride per day for 14 days). Group 2 and 3 were injected with gentamicin (respectively 5 and 80 mg/kg per day, *i. p.* for 14 and 7 days. GM injected at a dose (5mg/kg day intraperitoneally for 14 days decreased 8.00 % rats body weight. Rats receiving GM at a dose (80 mg/kg intraperitoneally for 7 days) lost about 15.11 % body weight. According to one-way analysis of variance between GM influence on behaviour positions and rear was 99.50 % ($P < 0.001$), head raise 96.50% ($P < 0.001$), sit

98.90% $P < 0.001$), hunch 88.90% ($P < 0.05$), head dip 100.0 % ($P < 0.001$), groom 98.60 % ($P < 0.001$), other behaviour structure 55.10 % ($P < 0.05$). Moreover, GM (80 mg/kg i.p. decreased concentration of Na, changed value of K and increased concentration of P in serum of Wistar rats. Influence of GM changed homeostasis of Na, K and metabolism of P in the organism of rats. There was tubular necrosis in kidneys from rats in the GM 80 mg/kg weight for 7 days treated group. There were an increased number of mesangial cells, massive tubular necrosis; the lumen of the tubules was filled with degenerate and desquamated epithelial cells. In the distal and proximal tubules was total necrosis. After treatment with GM were found inflammatory reaction in kidneys of rats. We conclude that rat treated with gentamicin 80 mg/kg body weight 7 days can be used as animal's model for investigation of nephrotoxicity.

Keywords: rat, GM, behaviour, sera, urine, kidney, histological investigation.

Ivadas. Pirmą kartą gentamicinas, kaip plataus veikimo aminoglikozidas, paminėtas mokslinėje literatūroje 1963 metais. Juo dažnai gydomi įvairių rūšių gyvūnai, sergantys urogenitalinių, kvėpavimo ir virškinimo organų ligomis. Ištirta, kad GM antibakteriškai veikia gramneigiamus ir gramteigiamus mikroorganizmus. Patekęs į mikroorganizmo citoplazmą, jis sutrikdo baltymų sintezės procesus. Išsiskiria aktyvios formos per inkstus glomerulų filtracijos būdu. Didelis šio aminoglikozidinio antibiotiko kiekis gali kauptis kepenyse, bet su tulžimi neišsiskiria. Be to, nustatyta, kad GM gali akumuliuotis endolimfoje bei perilimfoje ir sukelti destruktinius pokyčius ausyje, sutrikdyti garsų suvokimą (International programme, 2005). C. Martínez-Salgado ir kiti tyrėjai (2007) patvirtino GM nefrotoksinį ir ototoksinį poveikį, tačiau, nepaisant to, gentamicinas plačiai naudojamas klinikinėje praktikoje. S. O. Bello ir A. Chika (2009) ištyrė, kad antibakterinis GM poveikis yra labai didelis, o antibiotiko nefrotoksiškumą galima būtų sumažinti kartu vartojant B grupės vitaminų kompleksą.

Daugelis tyrėjų pastebėjo, kad įvairiuose organuose GM gali nuslopinti infekcijos židinių plitimą, bet dėl pasireiškiančių inkstų nepakankamumo sindromo požymių šio vaisto vartojimas pradėtas riboti (Kadkhodae et al., 2005; Souza et al., 2009). P. D. Walker ir S. V. Shah (1988), C. Yang su kitais tyrėjais (1995), B. H. Ali su bendradarbiais (2009) nustatė, kad aminoglikozidams priskiriamas antibiotikas GM ne tik žmonėms, bet ir laboratoriniams gyvūnams sukėlė inkstų funkcijos sutrikimą ir padidino organizme laisvųjų radikalų kiekį. Įvairiose šalyse GM veikimo efektyvumui ir dozėms bei savybėms aiškinti bei tikslinti kaip laboratorinis gyvūnas pasirinkta žiurkė, tačiau paaiškėjo, kad mokslininkų darbai, vertinant GM dozę, sukeliančią ryškius struktūrinius ir funkcinis pakitimus inkstuose, yra labai prieštaringi. Nepakanka informacijos ir apie inkstų pažeidimo mastą vertinant natrio, kalio, fosforo apykaitos sutrikimą.

R. Marre ir kiti mokslininkai (1980) nustatė, kad 5 mg/kg svorio sušvirkšto GM jaunų žiurkių organizme sukėlė mažesnius pakitimus nei suaugusių. I. Kiyatake ir kiti tyrėjai (2004) pastebėjo, kad 5 mg/kg GM, išvirkšto žiurkėms, sumažino tik guanidino acto rūgšties ekskreciją. Kitų pakitimų nenustatyta. Wistar linijos žiurkėms į podį kasdien 7 dienas iš eilės švirkščiant GM 60 mg/kg svorio, buvo pažeisti inkstų proksimaliniai kanalėliai (Lenz et al., 2005). Wistar linijos žiurkingoms patelėms švirkščiant 75 mg/kg svorio GM kasdien, buvo sukurta baltymų ekskrecija šlapime (Smaoui et al., 1994). Į raumenis išvirkštus 80 mg/kg svorio GM kasdien 6 dienas iš eilės, serume

nustatytas padidėjęs kreatinino ir šlapalo kiekis bei inkstų proksimalinių kanalėlių nekrozė (Ali, Bashir, 1994). Sprague-Dawley linijos žiurkių patinams, kurių svoris buvo 180–200 g, į raumenis švirkščiant GM (100 mg/kg kasdien) 5 dienas iš eilės, nustatyta nefropatija ir ląstelių proliferacija bei apoptozė glomeruluose (Bae et al., 2007). C. Martínez-Salgado su grupe mokslininkų (2004) nustatė, kad 100 mg/kg svorio gentamicino, kasdien išvirkščiant 6 dienas, sukėlė ne tik glomerulų ląstelių proliferaciją ir apoptozę (nors ląstelių skaičius buvo nepakitęs), bet ir poliuriją. Žiurkėms intraperitonealiai švirkščiant GM 160 mg/kg svorio, nustatyti nekrozės židiniai ir ląstelių apoptozė inkstų struktūroje (Vera-Roman et al., 1975; Begum et al., 2006).

Dėl GM dozės, norint nustatyti ryškų nefrotoksiškumo efektą, mokslinėje literatūroje yra įvairių nuomonių. Tas yra svarbu, norint sukurti žiurkės kaip gyvūno modelį *in vivo* tyrimams atlikti. Nors šiuo metu sukurta ir alternatyvių metodų (ląstelių kultūrų), visai pašalinti gyvūnus, testuojant naujai sukurtų vaistų veikimo efektyvumą ir remtis vien *in vitro* metodikomis, neįmanoma, nes tam reikalingas organizmas su nepažeista neurohumoraline reguliacija, t. y. gyvūno modelis *in vivo*. Sukūrus žiurkės, kaip gyvūno nefrotoksiškumo tyrimų, modelį, galima būtų plačiau taikyti ir ląstelių produktų terapiją bei pasiekti didesnio efektyvumo gydant daugelį sergančių žmonių ir gyvūnų, taip pat ir ligų prevencijoje.

Darbo tikslas – kuriant gyvūno modelį nefrotoksiškumui tirti, nustatyti GM terapinės ir didelės toksinės dozės įtaką Wistar žiurkių patinų svoriui, elgsenai, inkstų struktūrai, natrio, kalio bei fosforo kiekio kaitai kraujyje ir šlapime.

Medžiagos ir metodai. Tyrimas su Wistar linijos žiurkių patiniais atliktas Veterinarijos akademijos vivariume, vadovaujantis laboratorinių gyvūnų naudojimo etikos reikalavimais, laikantis Gyvūnų, skirtų eksperimentams ir kitiems mokslo tikslams, laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų, patvirtintų Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2008 12 18 įsakymu Nr. B1-639 (Žin., 2009, Nr. 287). Pagal Lietuvos laboratorinių gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2009 10 02 posėdžio protokolą Nr.4 gautas leidimas Nr. 0191 atlikti bandymą.

Tirti 12 suaugusių žiurkių patinų, kurių svoris buvo 300–400 gramų. Jie laikyti individualiai metaboliniuose narvuose („Techniplast“, Italija). Patalpos temperatūra buvo $21,2 \pm 2,1$ C, drėgmė – 50–55 proc., apšvietimo ciklas per parą šviesa/tamsa – 12:12 val. Šviesa buvo įjungta kasdien 8 valandą ryte. Gyvūnai šerti graužikams

skirtu pašaru, pagamintu AB „Kauno grūdai“, o geriamojo vandens gavo *ad libitum*.

Patinai buvo suskirstyti į tris grupes, po keturis kiekvienoje, nepažeidžiant 3 Rs principo. Gyvūnų adaptacijos periodas metaboliniuose narvuose truko tris dienas. I grupės žiurkėms į pilvo ertmę (*i. p.*) 14 dienų (kontrolė) kasdien buvo švirkščiamas fiziologinio tirpalo 1,5 ml (0,9 proc. NaCl). II grupės žiurkėms kasdien buvo švirkščiamas terapinė GM dozė – 5 mg/kg svorio *i. p.* 14 dienų, o III grupės – didelė toksinė GM dozė – kasdien 80 mg/kg svorio *i. p.* 7 dienas. Vaisto dozės pasirinktos atsižvelgiant į preliminarious užsienio šalių mokslininkų rekomendacijas (Bello, Chika, 2009; Kiyatake et al., 2004). GM buvo KRKA produktas injekcijoms – 40 mg/ml (Nr. 45854, naudoti veterinarijoje).

Žiurkių elgesio pozicijos įvertintos sušvirkštus paskutinę GM dozę pagal J. B. I. Rousseau ir kitų tyrėjų (2000) pasiūlytą metodiką. Gyvūnų svoris laboratorinėmis svarstyklėmis (Mettler P1200, Šveicarija) nustatytas bandymo pradžioje, t. y. prieš švirkščiant GM, po 7 ir 14 dienų. Diurezei įvertinti kasdien 9 val. ryte, buvo rinkti paros šlapimo mėginiai, 3 val. laikyti šaltai specialiaame transportavimo termose ir pristatyti į laboratoriją. Šlapimo mėginių biocheminiai tyrimai atlikti bandymo pradžioje, po 7 ir 14 dienų, o inkstų funkcinės veiklos atsistatymo procesams stebėti mėginiai tirti po 21 ir 35 dienų. Kraujo mėginiai prieš šeriant imti į centrifuginius mėgintuvėlius be antikoagulantų iš *v. jugularis* tris kartus, t. y. bandymo pradžioje, po 7 ir 14 dienų. Kraujo mėginiai buvo centrifuguoti 10 min. 1000 apsisukimų per min. greičiu, norint išvengti hemolizės (LabofugeGL, Heraeus Christ, Belgija). Išskirtas serumas iki pristatymo į laboratoriją buvo laikytas -20°C temperatūros šaldiklyje. Natriis (Na), kalis (K) ir fosforas (P) šlapime bei kraujo serume tirti automatinio biocheminio analizatoriumi „COBAS INTEGRA 400 plus“ (Tegimenta Ltd Roche, Šveicarija) taikant jonų selekcinę potenciometriją.

Gyvūnams eutanazija atlikta „Ketamidor“ (80 mg/kg,

i. p.) ir „Xylapan“ (5 mg/kg, *i. p.*) tirpalais bandymo paigoje, praėjus vienai parai nuo paskutinio GM švirkštimo. Atlikus laporatomiją histologiniams tyrimams paimti inkstų mėginiai. Jie fiksuoti 10 proc. formalino tirpale, dehidratuoti etanoliumi, įlieti parafine ir pjaustyti rotaciniu mikrotomu. Iš parafininio mėginio bloko atpjauti 4 mikrometrų storio audiniai, dažyti hematoksilinu ir eozinu bei tirti šviesiniu mikroskopu (OLIMPUS BX 41, Japonija) pagal N. A. Begum ir kitų mokslininkų (2006) metodiką. Statistinė duomenų analizė atlikta su „R 2.9.1.“ ([http // www. r-project. org](http://www.r-project.org)) paketu ir *WinExel* programa. Rezultatai laikyti statistiškai patikimais, kai $p < 0,05$.

Tyrimo rezultatai. Terapinės ir didelės toksinės GM dozės įtaka žiurkių svoriui pateikta 1 lentelėje. Švirkščiant GM po 5mg/kg svorio *i. p.* kasdien 14 dienų, suaugusių žiurkių svoris sumažėjo 8,00 proc., o švirkščiant GM kasdien po 80 mg/kg svorio, *i. p.* 7 dienas, gyvūnų svoris sumažėjo 15,11 proc. ($p > 0,05$).

Kaip matyti iš 2 lentelėje pateiktų duomenų, III grupės žiurkių elgesys smarkiai pasikeitė palyginti su kontroline grupe. Pakito judesiai, pozos refleksai, galvos padėtis, o gūžėsi ir rietėsi gyvūnas 53,40 proc. dažniau. Remdamiesi vienfaktorine dispersine analize galime teigti, kad GM III grupės žiurkių visoms elgesio pozicijoms turėjo neigiamos įtakos: domėjimuisi aplinka – 99,50 proc. ($p < 0,001$), galvos padėčiai – 96,50 proc. ($p < 0,001$), tupėjimo pozai ir uodegos laikymui – 98,90 proc. ($p < 0,001$), nugaros išlenkimui, rietimuisi, gūžimui – 88,90 proc. ($p < 0,05$), netipiniam galvos laikymui – 100,0 proc. ($p < 0,001$), kailio valymuisi – 98,60 proc. ($p < 0,001$), kitoms elgesio pozicijoms – ėdimui, gėrimui – 55,10 proc. ($p < 0,05$). I ir II grupės gyvūnų elgesys buvo panašus.

Kaip matyti iš 3 lentelėje pateiktų duomenų, II grupės žiurkių kraujo serume natrio kiekis nepakito, bet III grupės gyvūnų kraujo serume sumažėjo natrio ir kalio, o fosforo – padaugėjo palyginti su kontroline grupės žiurkių, bet duomenys statistiškai nereikšmingi ($p > 0,05$).

1 lentelė. GM įtaka Wistar žiurkių patinų svoriui, g

Grupė	Bandymo pradžioje	Po 7 dienų	Po 14 dienų
I (kontrolinė)	291,91±40,98	320,55±103,45	327,15±106,14
II (bandomoji)	314,1±35,45	290,1±24,15	305,85±35,57
III (bandomoji)	351,35±17,85	298,15±0,07	348,0±54,45

2 lentelė. GM įtaka Wistar žiurkių patinų, laikytų metaboliniuose narvuose, elgsenai

Elgesio pozicijos trukmė min	I (kontrolinė)	II (bandomoji)	III (bandomoji)
Domėjimasis aplinka	9,7±0,41	10,0±0,00***	0
Galvos padėtis – pakelta	11,7±0,41	15,5±6,34***	10,±0,00
Tupėjimo (sėdėjimo) poza, uodegos laikymas	15,0±0,00	15,0±0,00***	20,5±0,71
Nugaros išlenkimas, rietimasis, gūžimasis	12,7±1,47	11,5±4,71*	19,5±0,71***
Netipiška galvos padėtis – nuleista žemyn	0	0	10,0±0,00
Kailio valymasis	8,3±0,41	4,5±1,87***	0
Kitos (triukšmo, garso skleidimas, porfirino išsiskyrimas akių srityje, judėjimas, ėdimas, gėrimas, pašaro kaupimas)	2,6±0,02	3,5±0,01*	0

*** palyginta tarp II ir I; tarp III ir I ($p < 0,001$); * palyginta tarp II ir I ($p < 0,05$)

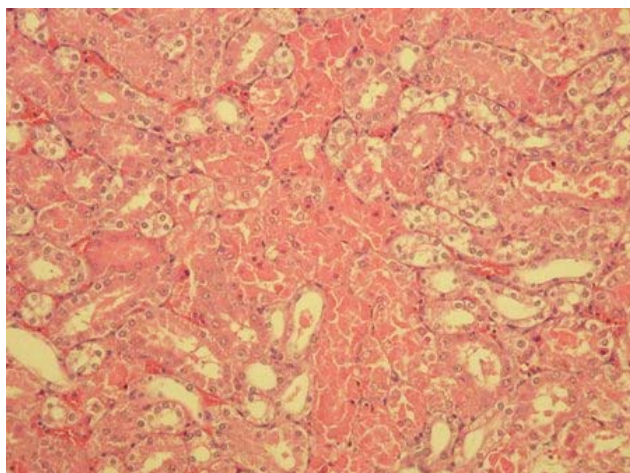
3 lentelė. GM įtaka natrio, kalio ir fosforo kiekiui žiurkių kraujo serume

Grupė	Na, mmol/L	K, mmol/L	P, mmol/L
I, kontrolinė	148,86±0,85	6,91±0,21	2,548±0,60
II, po 7 dienų	148,65±0,92	8,79±5,18	2,46±0,83
II, po 14 dienų	147,95±0,92	8,50±2,98	3,05±0,81
III, po 7 dienų	141,35±3,04	6,46±2,37	3,95±0,74
III, po 14 dienų	144,95±3,75	6,92±1,44	3,78±0,11

4 lentelė. GM įtaka natrio, kalio ir fosforo kiekiui žiurkių šlapime

Grupė	Na, mmol/L	K, mmol/L	P, mmol/L
I, kontrolinė	173,68±22,19	190,60±15,71	34,94±8,98
II, po 7 dienų	216,50±24,97	120,23±42,23	57,50±4,96
II, po 14 dienų	209,50±5,45	166,45±10,21	51,35±1,51
II, po 21 dienos	193,00±10,02	167,57±18,07	50,73±8,54
III, po 7 dienų	708,67±52,57	159,80±64,76	52,97±4,06
III, po 14 dienų	67,15±4,03	113,10±1,13	14,70±3,54
III, po 21 dienos	80,55±4,31	114,40±0,57	10,22±4,30
III, po 35 dienų	74,00±4,81	78,95±31,04	11,40±0,57

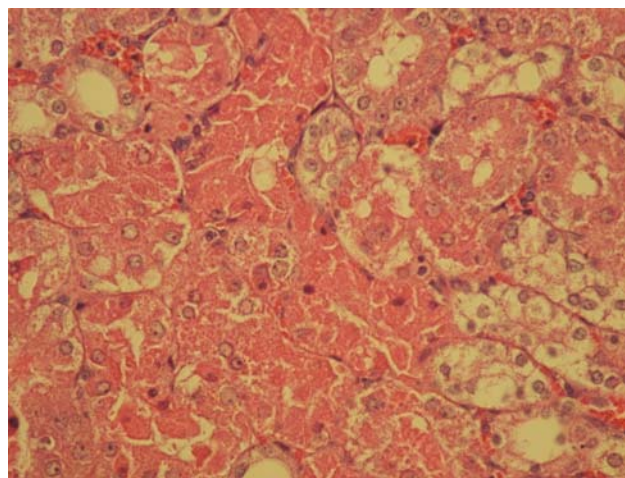
Kaip matyti iš 4 lentelės duomenų, GM veikiamame II grupės žiurkių šlapime natrio buvo 24,35 proc., o III grupės – 408,03 proc. daugiau palyginti su kontrole ($p>0,05$). Kalio II grupės žiurkių šlapime sumažėjo 12,68 proc., o III grupės – 16,58 proc. palyginti su kontrolinės gyvūnų ($p>0,05$). Fosforo II grupės žiurkių šlapime padaugėjo 46,96 proc., o III grupės – 51,40 proc. palyginti su kontrole ($p>0,05$). Be to, vertinant diurezę nustatyta, kad per parą kontrolinės grupės žiurkių patinai šlapimo išskyrė 10,75±0,83 ml, II grupės – 10,00±2,45 ml, o III grupės – 34,38±5,66 ml ($p<0,05$). Į pilvo ertmę žiurkėms švirkščiant ir terapinę, ir didelę toksinę GM dozę, pakito Na ir K homeostazė bei P metabolizmas.



1 pav. Proksimalinių kanalėlių nekrozė, GM švirkščiant (*i. p.*) 7 dienas (x 200); dažyta hematoksilinu-eozinu

Ryškūs histopatologiniai pokyčiai nustatyti tik III grupės žiurkių inkstuose. II grupės žiurkių inkstų atskirų struktūrų komponentai buvo be pakitimų ir nesiskyrė nuo kontrolės. Nustatyta, kad III grupės žiurkių inkstuose bu-

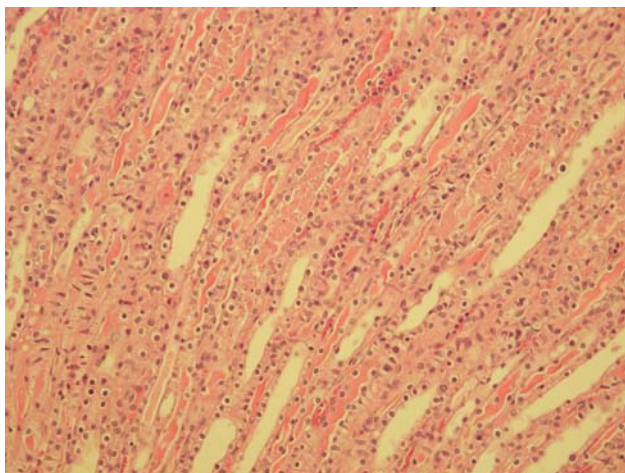
vo inkstų proksimalinių kanalėlių nekrozė ir obstrukcija (1, 2 pav.), nekrozė distalinių kanalėlių, prisipildžiusių deskvamavusių epitelio ląstelių (3 pav.) ir inkstų uždegimas (4 pav.).



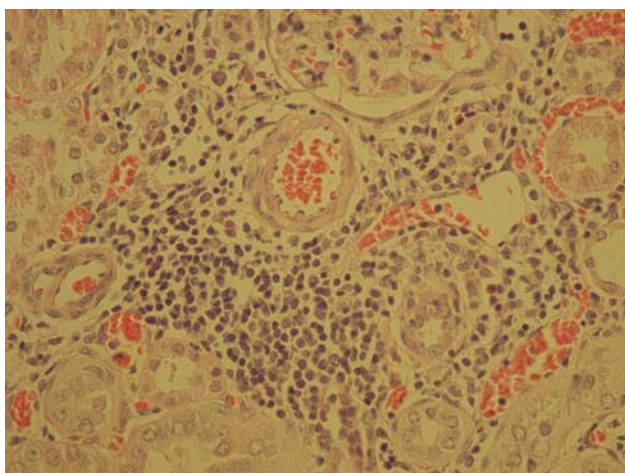
2 pav. Išplitusi proksimalinių kanalėlių nekrozė ir jų obstrukcija, GM švirkščiant (*i. p.*) 7 dienas (x 400); dažyta hematoksilinu-eozinu

Aptarimas ir išvados. Gydant sergančiuosius teigiamą GM poveikį nustatė nemažai mokslininkų, tačiau eksperimentais patvirtinta, kad šis aminoglikozidinis antibiotikas gali sukelti ir šalutinius organizmo pokyčius bei inkstų patologiją žmonėms ir laboratoriniams gyvūnams (Kays et al., 1991). Jau sukurtas žiurkės kaip gyvūno modelis chirurginiams bandymams vertinti, širdies, kraujagyslių, nervų ligoms, diabetui tirti, tačiau šiandien nėra vieningos nuomonės, ar žiurkė gali būti modelis ir nefrotoksiškumui tirti, taip pat tolimesnėms ir naujoms ląstelių produktų terapijos studijoms. Vertinant ir analizuojant užsienio šalyse atliktus nefrotoksiškumo paieškos bandymus, naudojant įvairias žiurkių linijas, nustatyti gana

prieštarinai kintantys natrio, kalio, fosforo bei kreatinino parametrai šlapime ir kraujyje.



3 pav. Distalinių inkstų kanalėlių nekrozė, GM švirkčiant (*i. p.*) 7 dienas (x 200); dažyta hematoksilinu-eozinu



4 pav. Uždegiminių ląstelių infiltracija III grupės žiurkės inkste, GM švirkščiant (*i. p.*) 7 dienas (x 400); dažyta hematoksilinu-eozinu

Mūsų tyrimų rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad suaugusiems žiurkių patinams 7 dienas iš eilės švirkščiant GM 80 mg/kg (*i. p.*) svorio, galima paveikti Na, K ir P apykaitą organizme. Pastebėti ir polidipsijos reiškiniai bei nustatyti poliurijos požymiai III grupės gyvūnų. To nebuvo švirkščiant GM 5 mg/kg svorio (*i. p.*) ir kontrolinėje grupėje. Kai kurie mokslininkai tvirtina, kad žiurkių tų pačių kraujo ir šlapimo parametrų kitimas gali duoti vertingos mokslinės informacijos apie inkstų funkcinio pažeidimo mastą, kuris priklauso nuo GM dozės. Tačiau kokia turi būti tiksli GM dozė, ryškiai pažeidžianti inkstų funkciją, taip pat natrio, kalio ir fosforo kiekio kaitą kraujyje ir šlapime, vieningos nuomonės nėra (Kumar et al., 2000; Kadkhodae et al., 2005; Souza et al., 2009). K. V. Kumar ir kiti mokslininkai (2000) nustatė, kad panašūs rezultatai švirkščiant žiurkei GM 80 mg/kg svorio buvo gauti tik tyrinėjant šlapime kalio kiekį. Jie taip pat ištyrė,

kad ši GM dozė sumažino šlapime kalio kiekį ir sukėlė inkstų kanalėlių nekrozę bei nefrotoksiškumo požymius, tačiau šių mokslininkų bandymas truko ilgiau nei kitų tyrėjų.

Koreguojant gyvūno graužiko kaip ligos modelį, ypač svarbūs tyrimai vertinant jo elgesio kategorijas ir atskiras etogramos pozicijas. Tokie tyrimai teikia objektyvios informacijos apie patologinių procesų vystymosi pradžią atskiruose organuose, streso veiksmus, diskomfortą ar skausmo požymių pasireiškimą ir fiziologinę gyvūno būklę. J. B. I. Rousseau su kitais tyrėjais (2000) teigė, kad gyvūno elgesio pozicijų nustatymas, vertinimas bei analizė ypač reikšmingi farmakologijai, žemės ūkio ir biomedicinos mokslų šakoms. Mokslinėje literatūroje nėra duomenų, kaip GM veikia žiurkių etogramas. Taigi mūsų tyrimų rezultatai reikšmingi kitų mokslininkų ateities eksperimentams biomedicinos mokslų srityje. Atlikto studijos leidžia daryti prielaidą, kad sušvirkštas 80 mg/kg svorio (*i. p.*) gentamicinas pakeitė elgseną, nes etogramose nustatyti ryškūs elgesio pokyčiai lyginant su II grupės gyvūnais (GM 5 mg/kg svorio *i. p.*) ir kontrole. Šioje grupėje nustatyta pakitusi gyvūnų elgsena – statiniai judesiai, netipinės galvos, kūno padėties pozos, gyvūnai nesidomėjo aplinka, padidėjo vandens poreikis bei poliucija. Visa tai darė įtaką natrio, kalio ir fosforo apykaitos sutrikimui organizme, sutriko reabsorbcijos procesai inkstuose. Sutrikus natrio ir kalio apykaitai pakinta ir kitų makroelementų kiekis kraujyje bei šlapime, vystosi kitos patologinės organizmo reakcijos.

Nustatėme, kad žymus nefrotoksiškumo efektas gali būti sukeltas suaugusių žiurkių patinams kasdien švirkščiant 80 mg/kg svorio (*i. p.*) GM 7 dienas iš eilės, ir nereikia dukart didesnės toksinės vaisto dozės, kaip rekomendavo kiti tyrėjai (Vera-Roman et al., 1975; Begum et al., 2006). Mūsų bandymo metu III grupės žiurkių patinams buvo sukelta totali inkstų nekrozė, o kanalėliai gausiai prisipildė degeneravusių ir deskvamavusių ląstelių mase.

Labai panašius histopatologinių tyrimų rezultatus gavo ir kiti mokslininkai (Kumar et al. 2000; Souza et al., 2009). K. V. Kumar su bendradarbiais (2000) ištyrė, kad žiurkėms GM reikėjo duoti 8 dienas (80 mg/kg svorio) ir tik tada įvyko daugiau nei 50 proc. inkstų žievės degeneraciniai procesai.

V. B. Souza su grupe mokslininkų (2009), C. Martínez-Salgado ir kiti tyrėjai (2007) patvirtino, kad GM (*i. p.*) naudojimo būdas gali sukelti patomorfologinius pažeidimus ir inkstų kapsulėje, ir kanalėliuose, sukelti jų obstrukciją degeneravusiomis ir deskvamavusiomis ląstelėmis, taip pat nekrozę ir apoptozę.

Išvados. Apibendrinami galime teigti, kad terapinės GM (5 mg/kg svorio) dozės injekcijomis į pilvo ertmę 14 dienų nepakeitė natrio, kalio bei fosforo apykaitos, neturėjo reikšmingos įtakos žiurkių svoriui, nepakeitė elgsenos, nepadarė neigiamo poveikio inkstams. Tačiau III grupės žiurkėms kasdien švirkščiant GM didelę toksinę dozę (*i. p.*) 7 dienas, vaistas ryškiai pakeitė etogramas, natrio, kalio ir fosforo apykaitos balansą bei inkstų struktūrą. Taigi žiurkė gali būti naudojama kaip gyvūno modelis nefrotoksiškumui tirti tolimesniuose moksliniuose ty-

rimuose, taip pat ir ląstelių terapijos produktams testuoti, kai GM kasdien švirkščijama 80 mg/kg svorio 7 dienas.

Literatūra

1. Ali B. H., Al-Salam S., Al-Husseini I., Nemmar A. Comparative protective effect of N-acetyl cysteine and tetramethylpyrazine in rats with gentamicin nephrotoxicity. *J. Appl. Toxicol.* 2009. Vol. 29. P. 302–307.
2. Ali B. H., Bashir A. A. Effect of fish oil treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Ann Nutr Metab.* 1994. Vol. 38. P. 336–339.
3. Bae E. H., Oh Y. W., Park J. W., Ma S. K., Ki chul Choi K.C., Lee J.U., Kim S.M., Kim S.W. Gentamicin decreases guanylyl cyclase activity in rat glomerulus. *Kidney Blood Press. Res.* 2007. Vol. 30. P. 81–87.
4. Begum N. A., Dewan Z. F., Nahar N., Mamun M. R. Effect of n-hexane extract of *Nigella sativa* on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Bnagladesh J Pharmacol.* 2006. Vol. 1. P. 16–20.
5. Bello S. O., Chika A. Dose-dependent amelioration of gentamicin-induced nephrotoxicity in adult Swiss Albino rats by vitamin B-complex- a preliminary study. *Trop J Pharm.* 2009. Vol. 8 (2). P. 111–116.
6. International programme on chemical safety, poisons. Information monograph: gentamicin sulfate 1994 (PIM 242). 2005. – [žiūrėta 2010-04-20]. – Internetė: <http://www.inchem.org/pages/pims.html>.
7. Yang C., Du X., Han Y. Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Renal Fail.* 1995. Vol. 17. P. 21–26.
8. Kadkhodae M., Khastar H., Faghidi M., Ghaznavi R., Zahmatkesh M. Effects of cosupplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol.* 2005. Vol. 90. P. 571–576.
9. Kays S. E., Wayne A., Crowell and Mary Ann Johnson. Iron supplementation increases gentamicin nephrotoxicity in rats. *J Nutr.* 1991. Vol. 121(11). P.1869–1875.
10. Kiyatake I., Nakamura T., Koide H. Urinary Guanidinoacetic Acid Excretion as an Indicator of Gentamicin Nephrotoxicity in Rats. *Renal Failure.* 2004. Vol. 26. N. 4. P. 339–344.
11. Kumar K. V., Naidu M. U. R., Shifow A. A., Ratnakar K. S. Probuocol protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Indian J Pharm.* 2000. Vol. 32. P. 108–113.
12. Lenz E. M., Bright J., Knight R., Westwood F. R., Davies D., Major H., Wilson I. D. Metabonomics with ¹H-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *Biomarkers.* 2005. Vol. 10. N. 2–3. P. 173–187.
13. Marre R., Tarara N., Louton T., Sack K. Age-dependent nephrotoxicity and the pharmacokinetics of gentamicin in rats. *Eur. J. Pediatr.* 1980. Vol. 133. P. 25–29.
14. Martínez-Salgado C., Eleno N., Imorales A., Perez-Barriocanal F., Arevalo M., López-Novoa J. Gentamicin treatment induces simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats. *Kidney Int.* 2004. Vol. 65. P. 2161–2171.
15. Martínez-Salgado C., López-Hernández F. J., López-Novoa J. M. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007. Vol. 223 (1). P. 86–98.
16. Rousseau J. B. I., Van Lochem P. B. A., Gispen W. H., Spruijt B. M. Classification of rat behavior with an image-processing method and a neural network. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers.* 2000. Vol. 32 (1). P. 63–71.
17. Smaoui H., Schaefferbeke M., Malliè J.P., Schaefferbeke J. Transplacental effects of gentamicin on endocytosis in rat renal proximal tubule cells. *Pediatric Nephrology.* 1994. Vol. 8. N. 4. P. 447–450.
18. Souza V. B., de Oliveira R. F. L., de Lucena H. F., Ferreira A. A. A., Guerra G. C. B., de Lourdes Freitas M.; de Souza Queiroz K. C., de Araújo Júnior R.F. Gentamicin induces renal morphopathology in Wistar rats. *Int. J. Morphol.* 2009. Vol. 27 (1). P. 59–63.
19. Vera-Roman J., Krishnakantha T. P., Cuppage F. E. Gentamicin nephrotoxicity in rats. I. Acute biochemical and ultrastructural effects. *Lab Invest.* 1975. Vol. 33 (4) P. 412–417.
20. Walker P. D., Shah S. V. Evidence suggesting a role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J. Clin Invest.* 1988. Vol. 8. P. 334–341.

Gauta 2010 04 28

Priimta publikuoti 2010 09 08