

## Akut Böbrek Yetmezlikli Sıçanlarda Gentamisin Toksisitesi

GENTAMYCIN TOXICITY IN ACUTE RENAL FAILURE IN TURKISH RATS

Dr.İşinsu KUZU\*, Dr.Hakan GÜRDAL,\*\*  
Prof.Dr.Özden TULUNAY\*, Prof.Dr.Cankat TULUNAY\*\*

\*Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji, \*\*Farmakoloji ABD, ANKARA

### ÖZET

*Bu çalışmada akut böbrek yetmezliği zemininde aminoglikozid nefrotoksitesisi incelenmiştir. Sıçanlarda gliserol ile akut böbrek yetmezliği oluşturularak, farklı dozlarda gentamisin bu değişikliklere etkisi zaman faktörüyle birlikte araştırılmıştır. Bu suretle gliserolle meydana getirilen akut böbrek yetmezliğinin, ışık mikroskopik düzeyde kullanılabilir bir ilaç nefrotoksitesisi tarama yöntemi olup olmayacağı da araştırılmak istenmiştir. Tarif edilen metodolojiye uygulanan değerlendirme sistemi, elde edilen istatistik sonuçlarına bakıldığında, bu nefrotoksik tablonun bir tarama yöntemi olabileceğini göstermektedir.*

**Anahtar Kelimeler:** Nefrotoksite, Akut böbrek yetmezliği, Gentamisin

T Klin Araştırma 1991,9:333-339

### SUMMARY

*Aminoglycoside nephrotoxicity is examined on the acute renal failed rats in this study. Glycerol is used for creating acute renal failure. The additional influences of gentamycin after glycerol administration is examined by the time factor. The histopathologic changes in the renal tubules are detected in the light microscopic level. The statistical results showed that, glycerol induced acute renal failure is a practical and an economical screening method, and also will be helpful on detecting renal influences of the other drugs.*

**KeyWords:** Nephrotoxicity, Acute tubular necrosis, Gentamycin

Turk J Resc Med Sci 1991,9:333-339

**İlaçların nefrotoksik etkilerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesi çeşitli güçlükler içerir. Düşük doz ilaç kullanımı anlamlı değişiklikler çok uzun zamanda ortaya çıkabilirken, yüksek doz kullanımda ise patolojik değişiklikler kısa sürede çok şiddetli şekildedir. Ayırıcı değerlendirmeye olanak vermeyecek şiddette ve diffüz lezyonlara yol açtığı gibi, kolaylıkla fatal sonuçlanır (1,2,3). Elektron**

**mikroskobu gibi toksik değişiklik basamaklarının ince ve detaylı incelenebileceği teknikler pratik ve ekonomik değildir. Bu çalışmada gliserolle oluşturulan akut böbrek yetmezliğinin, ilaçların nefrotoksik etkilerinin histopatolojik olarak araştırılmasında bir tarama yöntemi olarak kullanılmasının pratik ve anlamlı olup olmadığının anlaşılması amaçlanmıştır. Deney hayvanının ölümüne yol açmadan objektif ve mürerik parametrelere olanak verebilecek bir baz tablonun oluşturulabilmesi, ilaç etkilerinin araştırılması ve değerlendirilmesi için temel ihtiyaçtır. Kısa süreli ve ışık mikroskopik düzeyde, pratik, ucuz bir tarama yöntemi büyük öneme sahiptir.**

Geliş Tarihi: 20.1.1991

Kabul Tarihi: 4.5.1991

Yazışma Adresi: Prof.Dr.Özden TULUNAY  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Patoloji ABD (Dekanlık Binası)  
Sıhhiye, ANKARA

## MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada 200-250 gr. ağırlığında dişi erişkin sıçanlar kullanılmıştır. Deney öncesi sıçanlar standart odalarda en az üç gün bekletilmiş, standart yem ve su verilmiştir.

Gliserol uygulaması yarıyarıya dislile su ile seyreltilerek subkütan 10 ml/kg tek doz şeklinde yapılmıştır. Gentamisin günde iki defa 8 saat aralıklarla 15 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarda subkütan verilmiştir. İlaç uygulamasından sonra hayvanlar, makroskodik hematüri yönünden izlenmiş, ayrıca ölüm görülenler tesbit edilmiştir. Ölen hayvanlarda böbrek histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Deney hayvanları altı gruba ayrılmıştır;

Grup 1: %50'lik gliserol 10 ml/kg dozda verilmiş, 24,48,72 saatler sonrasında hayvanlar eter anestezi ile öldürülüp böbrekleri çıkarılmıştır.

Grup 2: %50'lik gliserol 10 ml/kg dozda verilmiş, bunun yarımında 15 mg/kg/gün Gentamisin verilmiştir. 24,48,72 saat sonra böbrekler çıkartılmıştır.

Grup 3: %50'lik gliserol 10 ml/kg tek doz ve 50 mg/kg/gün gentamisin iki doz verilip, 24,48,72 saat sonrasında böbrekler alınmıştır.

Grup 4: 15 mg/kg/gün gentamisin subkütan verilmiş, 48 ve 72 saat sonra böbrekler alınmıştır.

Grup 5: 50 mg/kg/gün gentamisin subkütan vöcrilmiş, 48 ve 72 saat sonra böbrekler çıkarılmıştır.

Grup 6: %50'lik gliserol 10 ml/kg tek doz ve 50 mg/kg/gün Sctfazidin verilmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonrasında böbrekler İncelenmiştir.

Her grupta en az altı sıçan kullanılmıştır.

Böbrekler %10'luk tamponlu formalin solüsyonunda 12-24 saat teshil edildikten sonra, parafin bloklara gömülüp 5 mikron kesitler halinde rutin Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskopik olarak incelenmiştir. Histopatolojik değerlendirme her örnekte X400 büyütme alanında yapılmıştır. Her örnekte böbreğin kortikal kısmı üç bölüme ayrılmıştır. Hemen kapsül altındaki 1/3 kısım, orta 1/3 kısım, iç 1/3 kısım şeklinde, ayrı ayrı birbirini takip eden hatlar boyunca değerlendirilmiştir. Değerlen 'irmede her bölümden en az bir X400 büyütme alanındaki tamamen nekroza uğramış, kısmen nekroza uğramış ve sağlam tübüller sayısal olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Kesitlerdeki patolojik bulguların üniform olmadığının tespiti

halinde işlemler random üç bölgede aynen uygulanarak, sonuç bunların ortalaması şeklinde kabul edilmiştir. Bunlar dışında proksimal tubulus epitel hücrelerinde vakuoler dejeneratif değişiklikler, rejeneratif değişiklikler, tübül lümenlerinde nekrotik artıkların ve eritrositlerin bulunuşu, damarlarda h i peremi varlığı kaydedilmiştir (Şekil 2).

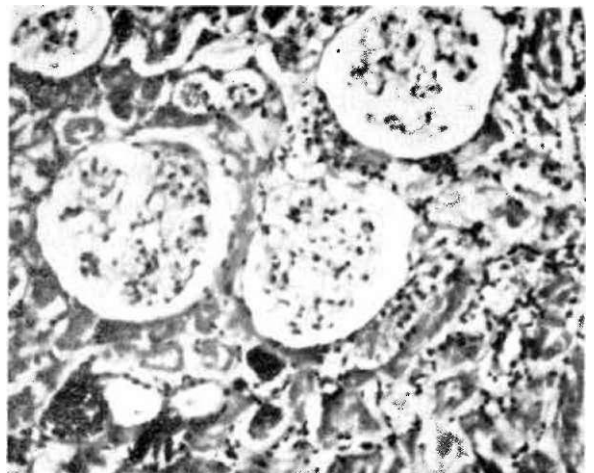
İstatisliksel değerlendirme Student t testi ile yapılmıştır.

## SONUÇLAR

Birinci grupta gliserol uygulamasından sonra 2 ile 3 saat içinde %90 hayvanda hematüri görülmüştür. Hayvanlarda spontan ölüm tesbit edilmemiştir. Makroskodik hematüri 24 saat sonra tamamen kaybolmuştur. Histopatolojik non parametrik olarak değerlendirilen kriterler Tablo Tde belirtilmektedir. Bunlar her grup için genel görüntüyü ifade eden özelliklerdir. Bunlara göre 10 ml/kg %50'lik gliserol uygulamasından sonra ilk 24

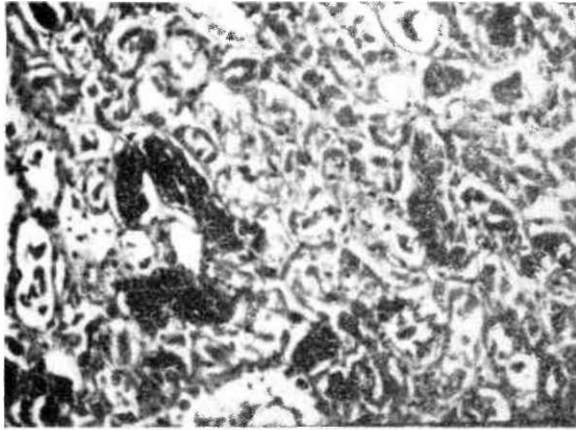
Tablo 1. Histopatolojik Olarak Değerlendirilen Nonparametrik Kriterler

'Tubulus lümenlerinde:	-Kan ve hemalüri -Nekrotik artıklar
'Tubulus epitelinde:	-Vakuoler dejenerasyon -Rejeneratif değişiklikler
'Damarlarda	-İ liperemi
•İnterstisyumda	-Kanama -İltihap hücreleri bulunuşu

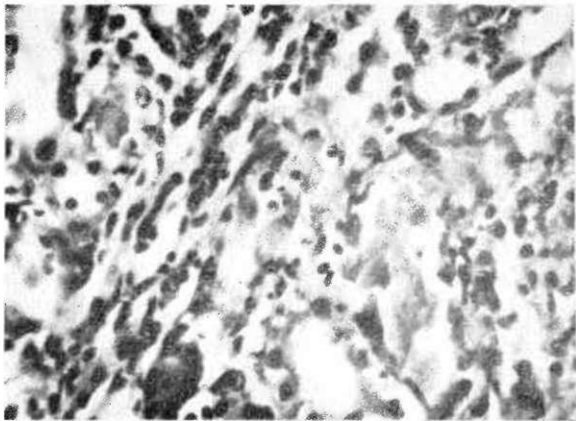


Şekil 1. Glomerüller arasında hemen tamamen nekroz gösteren tübüller görülmüyor. (Gliserol sonrası 24. saat) (HE,X100).

**saat içinde tübüllerde** yaygın nekroz ve dejeneratif değişiklikler, tübül lümenlerinde eritrosit ve nekrotik artıklar izlenmiştir (Şekil 3). 48 saat içinde **minimal rejenerasyon** bulguları subkapsüler alanlardan başlamak üzere görülmüştür (Şekil 4). 72 **saatte** bu rejenerasyon belirgin hale gelmiştir (Şekil 5). **Bu grupta** her değerlendirme sahasında **tamamen** nekroza uğrayan tübüller oranlarının karşılaştırılmasında, ilk 24 saatte en belirgin nekroz **dış 1/3 kısımda** saptanmıştır. Daha iç kısımlarda, **zamanla artmak** üzere nekroz geliştiği görülmüş, **ancak** bu dönemde **dış** kortekste rejenerasyon **varlığı dokunun tümünde** nekroz oranının yine **düşük kalmasına** neden olmuştur. Böylece bu grupta **48 ve 72. saatlerde** nekrozun giderek azaldığı **görülmüştür**.



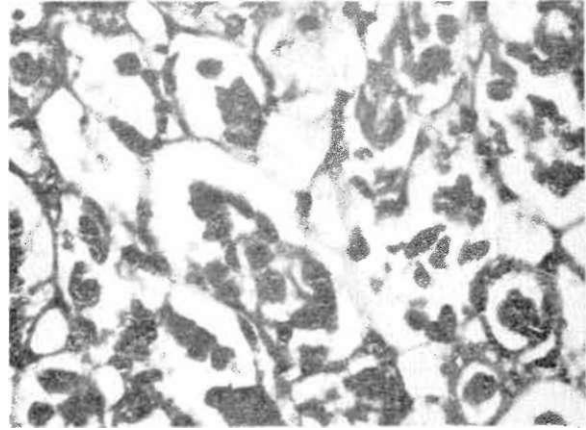
Şekil 2. Tübüllerde nekroz hakimiyeti ve kanama izleniyor (Gliserol-Gentimisin 50 mg/kg/gün sonrası 24. saat) (HE,X100).



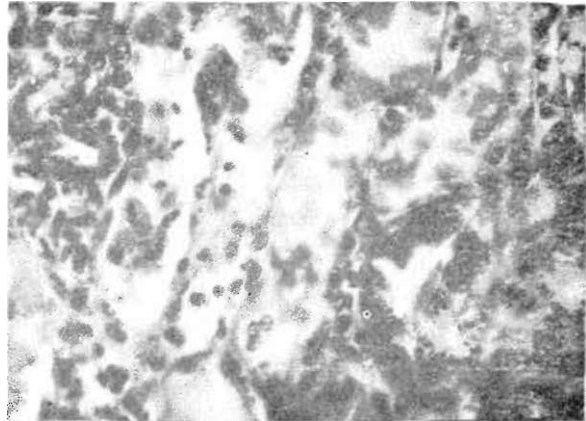
Şekil 4. İltihabi reaksiyon ve rejeneratif değişikliklerin başlangıcı. (Gliserol sonrası 48. saat) (HE,X400).

İkinci grupta 10 ml/kg'lık gliserol ve 15 mg/kg/gün gentamisin uygulanmasından iki üç saat sonra, tüm hayvanlarda hemaüri gelişmiştir, Hematini 12-24 saat devam etmiştir. Histopatolojik kriterler incelendiğinde, nekrozun 72. saatte yaygın olarak bulunduğu, ancak bu dönemde rejeneratif değişikliklerin yine subkapsüler alanlarda başladığı dikkati çekmiştir. Tamamen nekroza uğramış tübül oranları karşılaştırıldığında, 48. ve 72. saatlerde dış kortekste tek basma gliserol almış olanlara göre anlamlı şekilde yüksek oranda nekroz bulunduğu görülmüştür (Şekil 6). İç ve orta kortekste ise bu şekilde anlamlı fark ancak 72. saatte izlenmektedir (Şekil 7 ve 8).

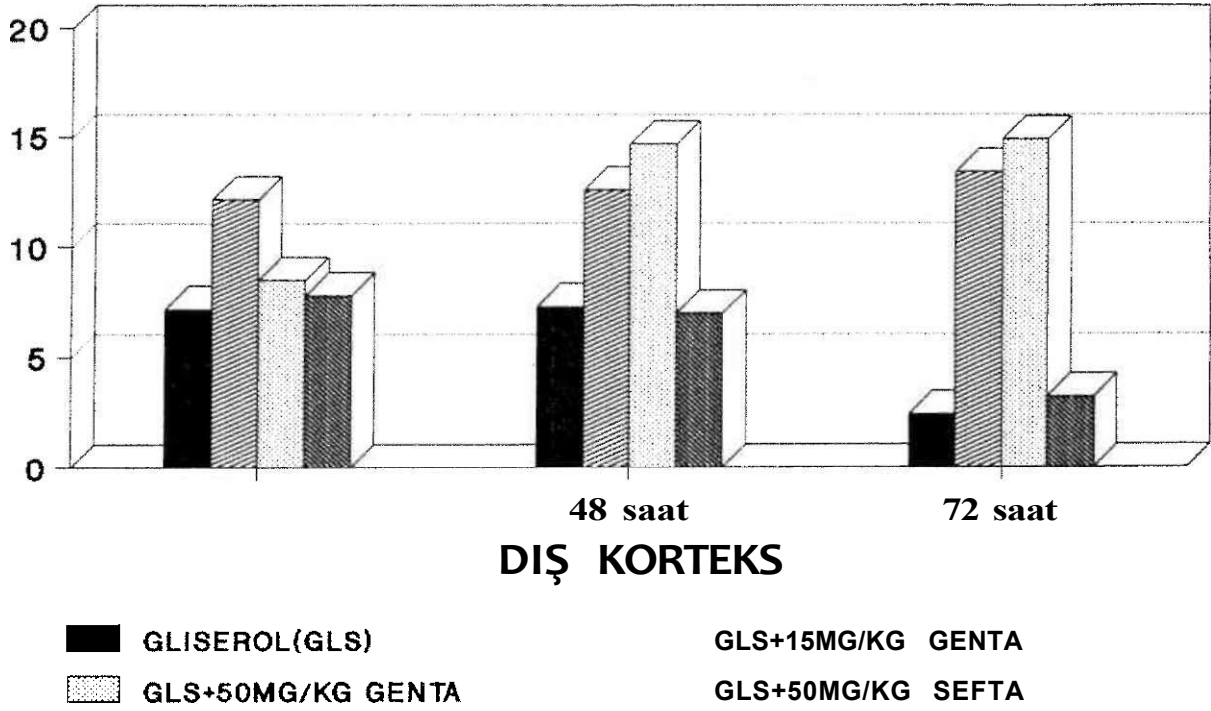
Üçüncü grupta gliserol ve 50 mg/kg/gün gentamisin kullanımı sonrası makroskopik hematürs



Şekil 3. Nekrotik tübülün yakından incelenmesinde, epitelin nekrotik ve lümenine dökülmüş olduğu görülüyor, (Gliserol sonrası 24. saat) (HE,X400).



Şekil 5. Belirgin rejeneratif olayda, miloz ve tamamen rejenerasyon tübülleri. (Gliserol sonrası 72. saat) (HE,X400).



Şekil 6. Tubuler Nekroz Sayısı (%100 nekroz gösteren)

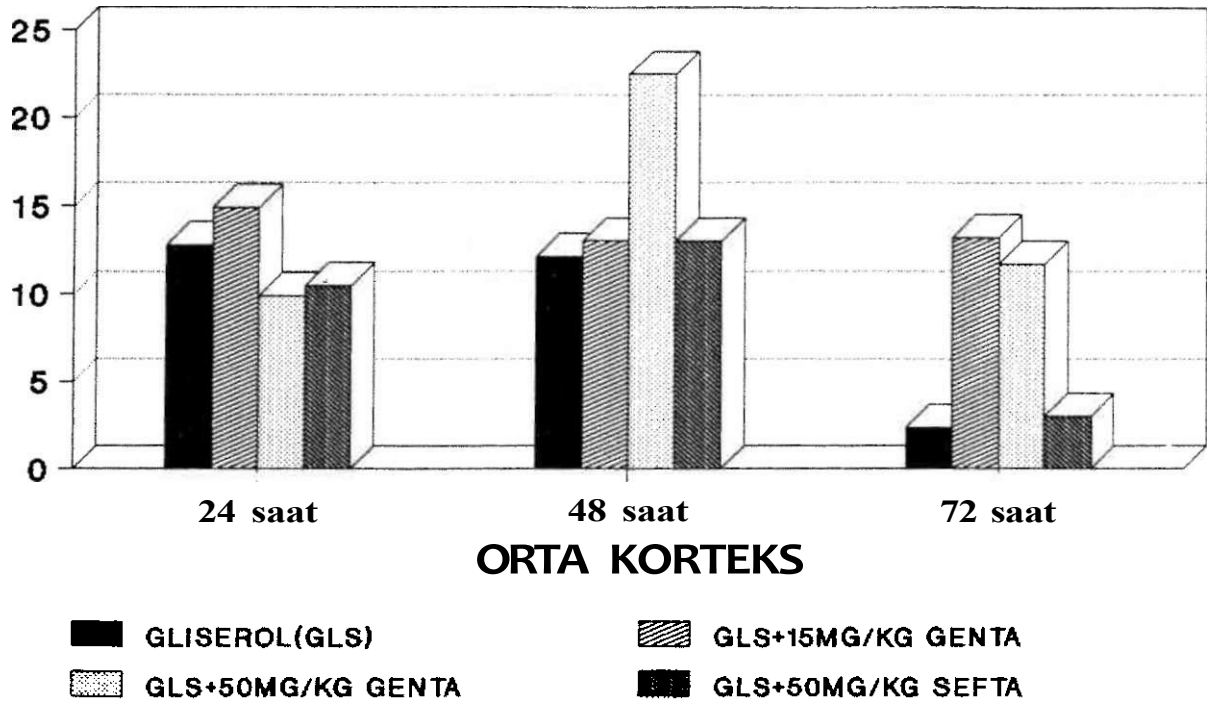
görülmüş, bu 24-48 saat sonra kaybolmuştur. Uygulamadan sonra ilk 12 saat içinde 2, 12-24 saat arasında ise 1 hayvan ölmüştür. Bunların böbrekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, çokyaygın nekroz ve hematüri görülmüştür. Bu grupta yaşayan diğer hayvanlarda da yaygın hematüri ve nekroz görülmüştür. Rejeneratif değişikliklerin daha geç ve minimal oranda bulunduğu dikkati çekmiştir. Tamamen nekroz olan tübül oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, bu grup ile tek başına aynı miktar gliserol kullanılan grup arasında 48. ve 72. saatlerde bütün korteks alanlarında anlamlı fark bulunduğu görülmüştür (Şekil 6,7 ve 8).

Dördüncü grupta 15 mg/kg/gün gentamisin kullanılmış, bu hayvanlarda makroskobik hematüri saptanmamıştır. Histopatolojik olarak 48. ve 72. saatler ortak değerlendirilmiş, ancak kayda değer belirgin patolojik bulgu saptanmamıştır.

Beşinci grupta 50 mg/kg/gün gentamisin ile makroskobik hematüri görülmemiş, spontan ölüm olmamıştır. Histopatolojik değerlendirme 48. ve 72. saatlerde ortak olarak yapılmıştır. Tübüllerde üniform olmayan nekroz ve rejenerasyon bulguları tesbit edilmiştir.

Altıncı grupta, 23 içinde hayvanların %85'inde hematüri görülmüştür. Bu 18-24 saat içinde kaybolmuştur. Hayvanların hiçbirinde spontan ölüm görülmemiştir. Histopatolojik değerlendirme 24,48,72. saatlerde yapılmıştır. Nekrozun daha belirgin olarak dış 1/3 kısımda bulunduğu, 48. saatte nekrozun yanında rejeneratif değişikliklerin bulunduğu ve dış korteksten içe doğru ilerlediği görülmüştür. 48. saatte minimal olan rejeneratif değişiklikler, 72. saatte belirgin şekilde dış korteksten itibaren izlenmiştir.

Her gruptaki üç ayrı korteks bölümündeki tamamen veya kısmen nekroza uğramış tubulusların ve sağlam tubulusların sayılarının Student t testi ile değerlendirilmesinde Şekil 6,7,8'deki grafikler elde edilmiştir. Tek başına gliserol kullanılan grup ile 15 mg/kg/gün gentamisin kullanılan grup arasında 24. ve 48. saatlerde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı, 72. saatte ise anlamlı fark ortaya çıkmıştır. Gliserol ile 50 mg/kg/gün seftazidinin kullanılan grupla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (Şekil 6,7 ve 8).



Şekil 7. Tubuler Nekroz Sayısı (%100 nekroz gösteren)

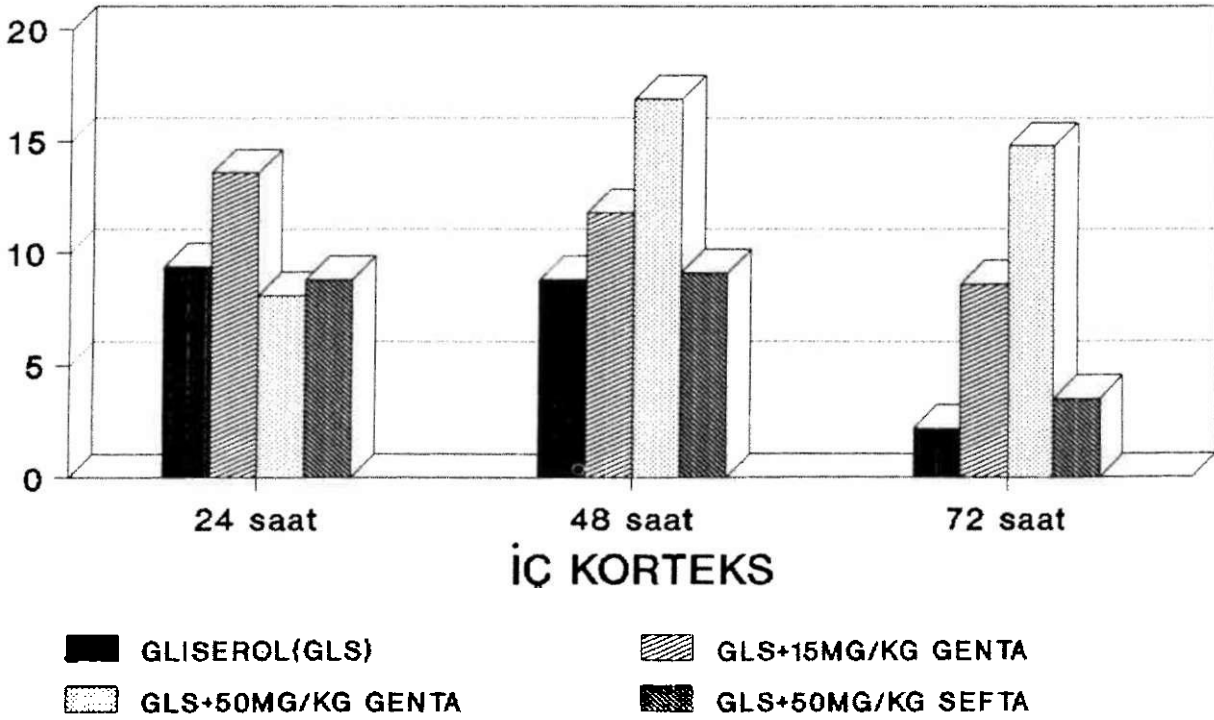
## TARTIŞMA

Aminoglikozidler çok çeşitli toksik etkileri olan antibiyotiklerdir. Bunların nefroloksik etkileri, böbreğin ilaçların eliminasyonundaki önemi düşünüldüğünde daha da anlam kazanır. Klinik ve deneysel çalışmalarda nefrotoksik etkinin incelenmesi mümkün olmuştur. İnsanlarda ve sıçanlarda nefrotoksik etki histopatolojik ve klinik gidiş olarak benzerdir. Bu nedenle sıçan modeli insanda oluşacak nefrotoksik değişikliklerin izlenmesi açısından uygundur (4).

Aminoglikozid toksisitesini etkileyen pek çok faktör vardır. Çeşitli aminoglikozidlerin de böbreğe etkileri farklılık gösterir. Aminoglikozid nefrotoksitesinde temel mekanizma, intrasellüler fosfolipazların inhibisyonu ve bunun sonucu proksimal tubuluslarda lizozomal fosfolipidozis şeklinde açıklanmaktadır. Bunun dışında pek çok mekanizma tanımlanmıştır (2,3,5). Gentamisin fosfolipaz inhibisyonunu diğer aminoglikozidlerden bir kısmına göre daha belirgin oluşturduğu ve nefrotoksik etkisinin daha belirgin olduğu tanımlanmıştır (5). Yeni yapılan bir çalışmada Ramsammy ve arkadaşları, primer tavşan proksimal tubulus hücre kültürlerinde ve sıçan böbrek korleksinde, gen-

tamisin phoshatidylinositol (PI) yoluyla agonist stimülasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir (6). Bunun hücrede pek çok organelin hasarında, plazma membranının streslere cevap kapasitesinde azalmaya sebep olduğu, lizozomal ve mitokondrial fonksiyon bozukluğuna yol açtığı belirtilmiştir. Aminoglikozidlerin nefroloksik etkilerinde rol alan pek çok faktör bulunur. Diüretik ve diğer nefrotoksik ilaçların birlikte kullanımı, yaş, dozaj, tedavi süresi, elektrolit balansı, hidrasyon, karaciğer hasarı, septik şok, total doz, birlikte başka böbrek hasarı bulunuşu bu faktörler arasında sayılabilir (1,4,5,7,8).

Düşük doz aminoglikozid kullanımıyla histopatolojik olarak toksite basamakları takip edilebilir. Başlangıçta lizozomal fosfolipid birikimi ile bu organelin hacimce arttığı bildirilmiştir. Bunun hücrede vakuolizasyon ve şişme şeklinde ortaya çıktığı belirtilmektedir. Hücrelerde kaba granülasyon meydana gelip, bunu izleyen devrede tüp epelinde fokal nekrozların olduğu gözlenmiştir. Bu nekrotik değişikliklerin muhtemel hızlı rejenerasyon nedeniyle ışık mikroskopik düzeyde histopatolojik olarak anlamlı değerlendirme güçlüğü ortaya çıkaracağı bildirilmiştir (3). Bu tüp



Şekil 8. Tubuler Nekroz Sayısı (% < 100 nekroz gösteren)

değişikliklerin net ve belirgin şekilde gözlenbilmesi elektron-mikroskopik ile mümkün görülmektedir. Bu ise tarama yöntemi olarak hiç bir şekilde pratik ve ekonomik değildir. Yüksek dozlarda farmakokinetik parametrelerin tanımlanmasında bozukluklar, hatalar ortaya çıkabilir. Yüksek dozlar ortaya çıkan patolojik bulguları artırmakta ve histopatolojik olarak yaygın nekroz ortaya çıkartmaktadır. Bunun yanında rejeneratif faaliyetlerde de artış gözlenmiştir. Diğer taraftan deneysel çalışmalarda histopatolojik değerlendirme için yüksek doz ilaç kullanımı uygun olmaktadır (3). Buna uygun olarak çalışmamızda tek başına düşük doz gentamisin kullanıldığında 72. saatte pek anlamlı mikroskopik değişiklikler göze çarpmamıştır. Yüksek doz ilaç kullanımında ise, ileri saatlerde üniform olmayan değişikliklerin tesbit edilmiş olması, ilaçların tekbaşına oluşturdukları nefrotoksik etkinin ışık mikroskopik düzeyde kısa sürede anlamlı, üniform patolojik bulgular oluşturmadığı görüşlerini desteklemektedir.

Gliscrol erken dönemde nefrotoksik etkisi ortaya çıkan bir maddedir. Bu etkinin morfolojik olarak belirlenmesi mümkündür. Bulgular; erken

dönemde proksimal lübül epitellerinde vakuolizasyon ve bunu izleyen nekroz şeklinde görülür (9). Gliscrolün renal toksisite mekanizmaları çeşitli teorilerle açıklanmaya çalışılmıştır. Proksimal tübüler nekroz ve akut böbrek yetmezliği gelişim mekanizmaları arasında, Renin-Anjiyotensin-Prosaglandin sisteminden söz edilmektedir (10,11). Gliscrolün oluşturduğu böbrek yetmezliği zemininde gentamisin nefrotoksik etkisinin daha kısa sürede ve ışık mikroskopik olarak anlamlı değişiklikler şeklinde ortaya çıktığı görülmüştür. Gliscrolün erken dönemde belirgin tübüler nekroz oluşturduğu, bunun 48. ve 72. saatlerde giderek azaldığı, bu dönemde rejeneratif değişikliklerin belirgin olduğu görülmüştür. Tek başına gentamisin yüksek doz kullanımında ışık mikroskopik düzeyde anlamlı değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Her ikisinin nefrotoksik etkilerinin incelemesinde bir tarama yöntemi olarak kullanılıp kullanılmayacağıdır.

Böbreğin fonksiyonel tabakası olan korteksin, birbirini takip eden üç bölüm halinde incelenmesi, nefrotoksik ve rejeneratif değişiklikleri anlamlı şekilde ölçme ve karşılaştırmada objektif olmayı

sağlamıştık. Diğer taraftan hatalı değerlendirme ve sonuçları da engelleyen bir yoldur.

Gentamisinin gliserol ile birlikte düşük doz kullanıldığı gruplarda tek başına gliserol kullanılan kontrol grubu ile arasında istatistiksel anlamlı değişiklikler 72. saatte ortaya çıkmaktadır. Oysa yüksek doz gentamisin kullanılan grupta bu daha erken dönemde, 48. saatte ortaya çıkıp, 72. saatte de devam etmektedir. Bu sonuçlar ilacın nefrotoksitesinde dozun önemini göstermektedir. İlk 24 saat erken dönem olarak değerlendirilebilir ve burada gliserol etkisinin olaya hakim olduğu düşünülmektedir. Ancak süre ilerledikçe gliserol etkisine gentamisin etkisi de eklenmekle, tübiiller nekrozun devam ettiği, kontrol gruplarıyla aralarında, düşük doz ilaç uygulamasında geç dönemde, yüksek dozlarda ise daha erken dönemde anlamlı değişiklikler görülmektedir.

Bu çalışmada ikinci bir kontrol grubu olarak üçüncü jenerasyon sefalosporinlerden, nefrotoksik etkisi olmadığı bilinen, Seftazidin kullanılmıştır. Seftazidin ile alınan sonuçlar, tek başına gliserol kullanılan grup ile anlamlı farklılık göstermemektedir (Şekil 6,7,8).

Sonuç olarak gentamisin etkisinin, tek başına kullanıldığından çok daha kısa süre içinde ışık mikroskopik düzeyde ortaya konulabilecek, istatistiksel olarak anlamlı değişiklikleri, gliserolle oluşturulan akut böbrek yetmezliği zemininde bulundurduğu izlenmektedir. Bu yöntem, ilaçların nefrotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılacak pratik, ekonomi ve kolay uygulanabilen bir tarama yöntemidir.

## KAYNAKLAR

1. Hennet WM, Flamp CM, Gilbert ON, Parke, RA, Porter GA: The influence of dosage regimen on experimental Gentamycin Nephrotoxicity. *The J Infect Dis* 1978, 140 (4):576-80.
2. Davis BD: The lethal action of Aminoglycosides. *J Antimicrob Chemol* 1988, 22:1-3.
3. Tulkins PM: Experimental studies on nephrotoxicity of Aminoglycosides at low doses. *The Am J Med* 1986, 80 (Supp6H):105-14.
4. Lee SM, Michal LT: The prospective effect of Nitrendipine on Gentamycin Acute Renal Failure in Rats. *Exp Mol Path* 1985, 43:107-14.
5. John JF: What Price Success? The continuing saga of the Toxic/Therapeutic Ratio in the use of Aminoglycoside Antibiotics. *The J Infect Dis* 1988, 158 (1): 1-22.
6. Ramsamy LS, Joslovit/ C, Kaloyanides GI: Gentamycin Inhibits Agonist Stimulation of the Phosphatidylinositol Cascade in Primary Cultures of Rabbit Proximal Tubular cells and in Rat renal cortex. *The J Pharm Exp Ther* 1988, 247(3):989-96.
7. Prame PP, Phair JP, Walanankom C, Bannister WP: Pharmacologic factors Associated with Gentamycin Nephrotoxicity in Rabbits. *The J Infect Dis* 1977, 135 (6):952-6.
8. Sande MA, Mandell GL: Antimicrobial agents. In: Goodman AG, Gilman I, eds: *The pharmacological basis of therapeutics* 1986, 1167-79.
9. Ayer G, Wyler GT, Truniger B: Intra renal hemodynamics in glycerol induced myohemoglobinuric acute renal failure in the Rat. *Circ Res* 1971, 29:128-35.
10. Baronowski RL, Wesienfelder C, Kurtzman NA: Intrarenal Renin and Angiotensin in glycerol induced acute renal failure. *Kidney Intern* 1978, 14:576-84.
11. Banabe JH, Klarh S, Hoffman IK, Morrison AR: Production of Thromboxane A2 by the kidney in Glycerol induced Acute renal Failure in the Rabbit. *Prostaglandins* 1980, 19 (2):55-70.