

التأثير الوقائي للفيتامين A على السمية الكلوية المحدثة بالفانكوميسين عند الجرذان

ربا ياسر السروجي¹، أ.د. شذى اللحام²

¹ ماجستير في قسم الأدوية والسموم، اختصاص علم تأثير الأدوية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق
² أستاذ في علم تأثير الأدوية والسموم، كلية الصيدلة، جامعة دمشق.

الملخص:

الهدف: الفانكوميسين هو صاد حيوي من زمرة الغليكوبيبتيد وهو فعال ضد الجراثيم ايجابية الغرام بما فيها الجراثيم المكورة العنقودية المقاومة للميثيسلين، من الآثار الجانبية لاستخدام الفانكوميسين حدوث السمية الكلوية، حيث تتدخل الجذور الحرة في الآلية الإمرضية، أجريت هذه الدراسة للتحقق من التأثير المحتمل لفيتامين A في الوقاية من السمية الكلوية المحرصة بالفانكوميسين.

الطرائق: قسمت حيوانات التجربة في الدراسة إلى: الشاهدة الطبيعية، الشاهدة المرضية، مجموعة الفيتامين A، حيث أعطي فيتامين A بجرعة 4000 IU/kg قبل أربعة أيام من إعطاء الفانكوميسين بجرعة 300 mg/kg واستمر الإعطاء لمدة اسبوعين. عُزل المصل لتحديد المعالم الحيوية لوظائف الكلية، وفُصلت الكلية لإجراء الفحوص النسيجية ولتحديد معالم الإجهاد التأكسدي.

النتائج: إزدادت أكسدة الليبدات في نسيج الكلى بشكل ملحوظ بعد إعطاء الفانكوميسين بالإضافة لخلل في وظائف الكلية. سبب إعطاء فيتامين A انخفاضاً في أكسدة الليبدات، والبولة، كما لاحظنا وجود تحسن واضح في الفحص النسيجي لكلى المجموعة الوقائية.

الخلاصة: لفيتامين A تأثير إيجابي على منع السمية الكلوية المحرصة بالفانكوميسين من خلال التأثيرات المضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: فيتامين A، الفانكوميسين، أكسدة الليبدات، السمية الكلوية.



Submitted: 12/2/2022

Accepted: 28/3/2022

Copyright: Damascus University Syria.

The authors retain copyright under CC BY-NC-SA

ISSN: 2789-7214 (online)

<http://journal.damascusuniversity.edu.sy>

The protective effect of Vitamin A on Vancomycin-induced Nephrotoxicity in Rat

Rouba Yasser Al-Sroji¹, Prof. Shaza Al-Lahham²

¹ Master's degree in pharmacology, at the department of pharmacology and toxicology, faculty of pharmacy, Damascus University

² A professor at the department of pharmacology and toxicology, faculty of pharmacy, Damascus University

Abstract:

Aim: Vancomycin (VAN) is a glycopeptide antibiotic which is active against gram positive bacteria including methicillin resistant Staphylococci. Free radicals are involved in the pathogenesis of vancomycin-induced nephrotoxicity. Therefore, the present study was conducted to investigate the antioxidant potential of Vitamin A against the nephrotoxicity of vancomycin in rats.

Methods: Animals used in this study were divided into; Control, VAN treated, VAN + vitamin A treated group. vitamin A (4000 IU/Kg) was administered 4 days before and 2 weeks simultaneously with vancomycin (300 mg/kg). Serum separated to determine kidney function parameters. Kidneys dissected out for histological examination and for assay of oxidative stress markers.

Results: Lipid Peroxidation (MDA) in kidney tissue were significantly increased after vancomycin administration. VAN produced kidney dysfunctions. The presence of Vitamin A with vancomycin caused reduction in induction levels of MDA, urea and creatinine in kidney.

Conclusions: Vitamin A has beneficial influences and could be able to antagonize vancomycin nephrotoxicity.

Keywords: Vitamin A, Vancomycin, Lipid Peroxides, Nephrotoxicity.

المقدمة:

غشاء الميتكوندريا تكون الفيتامينات المنحلة بالدم ذات تأثير مضاد للأكسدة أفضل من المنحلة بالماء. (Ocak et al., 2007). (328-333)

من الأساليب الوقائية أيضاً تعزيز الإفراز الأنثوي للفانكوميسين renal excretion لخفض السمية الكلوية المرتبطة به وقد نجح fosfomycin و cilastatin في ذلك (Elyasi et al., 2013). (747-754)، كما يمكن أن نمنع عودة النطاق الفانكوميسين من النبيب القريب وهذا ما استطاع cilastatin فعله حيث ثبت المستقبل البروتيني المسؤول عن عودة النطاقه مما قلل من مستويات الفانكوميسين المصلية وبالتالي السمية (Hori et al., 2017). (1783-1791)، وبالتالي نستنتج أن العوامل التي تمنع تراكم الفانكوميسين في المصل أو التي تتمتع بتأثر مضاد للأكسدة قادرة على الوقاية من السمية الكلوية المحدثه به (Palace et al., 1999). (746-761)، يتواجد الفيتامين A في الأغذية النباتية على شكل طليعة provitamin A وبتدعى بالكاروتينويدات carotenoids (مثل β -carotene, β -cryptoxanthin) والتي تتواجد في الخضراوت مثل السبانخ والسلق والقرع والجزر والفواكه مثل الجزر والمانجو والبابايا والذرة الصفراء. (Conaway et al., 2013). (766-797) ومن مصادر حيوانية: مثل السمك والكبد وصفار البيض ومنتجات الألبان مثل الجبن والحليب والزبدة، ويتواجد فيتامين A فيها على شكل أحماض دهنية طويلة السلسلة للريتول وتدعى باستيرات الريتينيل retinyl esters. (Conaway et al., 2013). (766-797) يتم حلمهة استيرات الريتينيل عن طريق أنزيمات البنكرياس والأمعاء ويتحرر الريتول منها ليتم امتصاصه عن طريق الخلايا المخاطية في الأمعاء حيث يتم نقله الى الخلايا المعوية عن طريق البروتينات الرابطة للريتول الخلوية CRBP II كونه مركب غير منحل في الماء. (Conaway et al., 2013). (766-797) يتم على الريتينول الناتج (سواء من استيرات الريتينيل أو من الكاروتينات) عملية أسترة بالاقتران مع حموض دسمة طويلة السلسلة فيتشكل ريتينيل أستر retinyl ester الذي يتم ربطه في مرحلة لاحقة مع ليبيدات أخرى مثل (cholesterol, cholesterol esters, triglycerides) فتتشكل جسيمات تدعى بالكيلوميكرونات chylomicrons التي تنتقل

يعتبر الفانكوميسين vancomycin من أهم الصادات الحيوية وهو المفضل في حالة المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين، ولكنه ارتبط مع السمية الكلوية الكبيرة، صنفت هذه السمية في بداية انطلاق استخدام الفانكوميسين عام 1958 على أنها سمية مرتبطة بالشوائب التي ترافق الفانكوميسين في الأشكال الصيدلانية المصنعة، فتم تحضير الفانكوميسين بشكل نقي 90-95% ومع ذلك بقيت السمية الكلوية مشكلة كبيرة تقف في وجه استخدامه في الحالات الطارئة. (Filippone et al., 2017). (459-469)

الآلية الكامنة وراء السمية الكلوية التي يسببها الفانكوميسين غير واضحة تماماً حتى الآن، ولكن تبين أن الفانكوميسين يسبب تغيرات في وظائف الميتوكوندريا، وأيضاً يؤثر في عملية التكاثر proliferation لخلايا النبيب القريب proximal tubular cells (PTC) في الزجاج (King and Smith, 2004). (797-803) ثم اتجهت الدراسات لتركز على آلية الاجهاد التأكسدي oxidative stress التي تحدث في خلايا النبيب القريب عند حصول السمية الكلوية، علماً أن هذه السمية مرتبطة بالجرعة، أي كلما زادت جرعة الفانكوميسين، ازدادت السمية الكلوية (Elyasi et al., 2013). (747-754). وقد وجد أن الفانكوميسين يحرض الموت المبرمج لخلايا النبيب القريب عن طريق الخلل بوظائف الميتوكوندريا ونفوذية غشائها لتنتج زيادة من أنواع الأوكسجين التفاعلية ROS، بالإضافة لأكسدة الفوسفوليبيدات (cardiolipin) فسي غشاء الميتوكوندريا. (Sakamoto et al., 2017). (48-56)

الوقاية والمعالجة لهذه السمية تكون في تحييد الجذور الحرة أو تعزيز مضادات الأكسدة الداخلية حيث أبدت فعالية واضحة في ردع هذه السمية مثل melatonin (Celik et al., 2005). (325-332) والكرمين (Elyasi et al., 2013). (747-754) وأيضاً عن طريق الفيتامينات التي تتمتع بتأثير مضاد للأكسدة كفيتامين E وفيتامين C، ولكن على الرغم من أن التأثير المضاد للأكسدة لفيتامين C أعلى من فيتامين E إلا أن التأثير الوقائي لفيتامين E كان واضحاً أكثر من فيتامين C وهذا بسبب اختلاف الانحلال بين الماء والدم، فبحسب آلية السمية التي تحدث في

التعرض الجائر لأشعة الشمس وتقليل التجاعيد، ونخص بالذكر isotretinoin لعلاج الحالات المعقدة والشديدة من حب الشباب العقدي المعدن، ولعلاج الصدفية والتهاب المفاصل. مؤخراً دُرس إدخال فيتامين A في علاج ابيضاض الدم النخاعي الحاد (APL)، ودُرس على سرطان الثدي والرئة والقولون لتداخل المسارات الخلوية الخاصة به مع مسار الموت الخلوي المبرمج للخلايا وتدخله في التمايز (Alvarez et al., 2014, 114-125). وفي هذه الدراسة سنهدف لمعرفة التأثير المضاد للأكسدة الذي يتمتع به فيتامين A وإمكانية الاستفادة من هذا التأثير في الوقاية من السمية الكلوية المحرصة بالفانكوميسين.

مواد البحث وطرقه:

حيوانات التجربة

Experimental animals

جرى العمل على 21 جرذاً مخبرياً ذكراً بالغاً أبيض من سلالة Albino Wistar بوزن يتراوح بين 230-300غ، تم الحصول عليها من مركز الدراسات والبحوث العلمية.

وضعت الجرذان في حواضن حيوانات التجربة في كلية الصيدلة -جامعة دمشق، ضمن أقفاص تؤمن لها وصولاً حراً وميسراً للماء المقطر والغذاء بحيث لا يحتوي القفص الواحد على أكثر من 4 جرذان، وحفظت الحيوانات في بيئة ذات دورة نمطية من النور والظلمة (12 ساعة ضوء/12 ساعة ظلام) وبشروط بيئية مضبوطة من درجة الحرارة ثابتة $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ، والرطوبة أقل من 60% وتركت الحيوانات لتتكيف مع بيئة الحواضن قبل البدء بالتجربة.

الأدوية المستعملة:

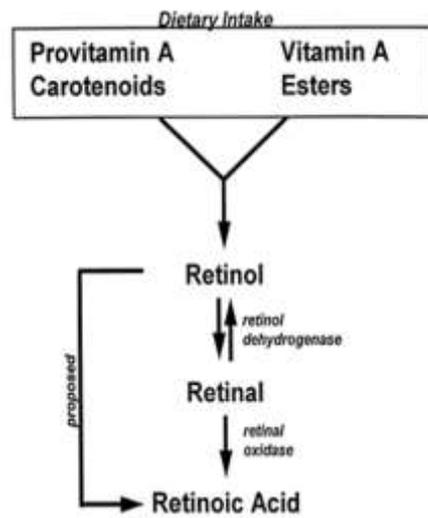
Drugs used

فانكوميسين vancomycin: من شركة KOREA UNITED PHARM بشكل مسحوق أبيض جاف، حُلّ في سيروم ملحي 0.9% (مصل فيزيولوجي).

فيتامين A: تم الحصول عليه بشكل Retinyl Acetate من شركة XIAMEN KINGDOMWAY BIOTECH "China"

الى الأوعية للمفاوية. تتواجد في مجرى الدم بقايا الكيلوميكرونات والتي تحتوي على استيريات الريتينيل وذلك بعد أن تمت حلمة ثلاثي الغليسيريدي الموجود في الكيلوميكرون عبر أنزيم lipoprotein lipase وإضافة apolipoprotein E بدلاً عنه (Conaway et al., Palace et al., 1999, 746-761, 2013, 766-797). تلتقط خلايا الكبد هذه البقايا الكيلوميكرونية عن طريق receptor-mediated endocytosis فتحرر استيريات الريتينيل ويتم عليها عملية حلمة لتعطي retinol وهنا نكون أمام خيارين: اذا كان الجسم ليس بحاجة إلى الريتينول فيتم تخزينه على شكل retinyl ester في الخلايا النجمية الكبدية HSC، فالكبد هو المخزن الرئيسي لفيتامين A (70% من فيتامين A) أما اذا كان الجسم بحاجة للريتينول، يتم ربطه مع بروتينات ناقلة لينتقل الى الدم ثم الخلايا الهدف. (Conaway et al., 2013, 766-797).

فعندما يكون الخيار هو الانتقال الى مجرى الدم فلا بد من ربط الريتينول في الكبد مع البروتين الناقل له RBP فيتشكل معقد retinol-RBP ثم تعود خلايا الكبد لتقوم بعملية اقتتران بين هذا المعقد و بروتين ضخم يدعى transthyretin (يصنع في الكبد) ونتيجة هذا الارتباط تصبح الكلى عاجزة عن تصفية الريتينول عن طريق الترشيح الكبيبي. (Palace et al., 1999, 746-761).



الشكل (1): استقلاب فيتامين A في الجسم (Palace et al., 1999, 746-761)

أكثر التأثيرات الفيزيولوجية لفيتامين A التي تستخدم على نطاق واسع هي علاج حب الشباب المعتدل والجلد المتضرر من

تصميم الدراسة:

Experimental design

قسمت الجرذان إلى ثلاث مجموعات (1): المجموعة الشاهدة تتلقى الماء المقطر عن طريق الفم والمصل الفيزيولوجي عن طريق الحقن داخل الصفاق، (2): مجموعة الفانكوميسين VAN التي تتلقى الفانكوميسين عن طريق الحقن داخل الصفاق بجرعة 300 mg/kg لمدة 7 أيام (Ocak et al., 2007). (328-333)

(3): مجموعة الفيتامين A التي تتلقى الفيتامين A على شكل Retinyl Acetate بجرعة 4000 IU/Kg لمدة 14 يوم (Cha et al., 2016)، بالإضافة للفانكوميسين بحقنه داخل الصفاق بجرعة 300 mg/kg لمدة 7 أيام، حيث يعطى فيتامين A قبل البدء بحقن الفانكوميسين بأربعة أيام.

التضحية بالحيوانات:

Animal sacrificing

في اليوم الخامس عشر ضُحي بحيوانات التجربة بحجز الجرذ في حجرة مشبعة بالايتر الايتيلي. ثم سحب الدم عن طريق بزل القلب cardiac puncture (Beeton et al., 2007). نُقل الدم بالمتفلة وأخذ المصل الناتج لاجراء معايرات البولولة. استخرجت الكلية اليسرى ووزنت على الفور ثم وضعت في عبوات الفورمول لغرض التشريح النسيجي لها، بينما استخرجت الكلية اليمنى ووزنت ثم وضعت بعد قسمها بشكل طولي من أجل اختبارات MDA على نسيج الكلية.

فحص أكسدة الدهون:

Assay of lipid peroxidation (TBARS)

يعتبر lipid peroxidation مؤشر هام indicator على إصابة الغشاء الخلوي الناتج عن أنواع الأوكسجين التفاعلي، حيث تمت معالجة عينات الكلية مع وقاء فوسفاتي بارد (PH:7.4, Mm50)، وذلك باستخدام مجانس homogenizer وحُدّد محتوى كل عينة من Malondialdehyde (MDA) من خلال التفاعل مع كاشف thiobarbituric acid وذلك حسب Kheradmand A وزملاؤه (Kheradmand et al., 2009).

(335-340)

تحديد مستويات اليوريا في المصل:

Determination of serum urea

أجريت مقياسة اليوريا بطريقة لونية وفق عتيده (Biosystems, Barcelona, Spain) وباستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي.

الفحص النسيجي للكلية:

Histopathological examination of kidneys

قسمت أجزاء الكلية ووضعها في الفورمالين 10%، ثم تلتها خطوات التجفيف وادماج البارافين ثم تقطع قوالب البارافين لشرائح ذات سماكة 5 ميكرون وينزع البارافين عنها وتلون بملون haematoxylin and eosin ثم تدرس بواسطة المجهر الضوئي. درست التغيرات الظهارية الأنبوبية tubular epithelial alterations وهما التوسع النسيبي tubular dilatation والتجعي النسيبي tubular vacuolation. حيث تم تصنيف التغيرات على الشكل، 0: لا توجد إصابة، 1: الإصابة شملت 25% من الظهارة الأنبوبية، 2: الإصابة شملت 50-25% من الظهارة الأنبوبية، 3: الإصابة شملت 50-75% من الظهارة الأنبوبية، 4: الإصابة شملت 100-75% من الظهارة الأنبوبية.

التحليل الإحصائي

Statistical analysis

أجريت الدراسة الإحصائية باستخدام البرنامج الإحصائي prism (Version 8). تم التعبير عن البيانات الرقمية بشكل (متوسط \pm الخطأ المعياري للمتوسط) (mean \pm standard error of the mean SEM)، وتم تقييمها من خلال اختبار تحليل التباين الأحادي (ANOVA one-way analysis of variance) متبوعاً باختبار tukey للمقارنات المتعددة، وذلك لإجراء المقارنات بين المجموعات بما يخص البيانات المعلمية (مستوى البولولة، تغير وزن الكلية/وزن الجسم، MDA). أما الدراسة النسيجية التي استخدمت بيانات ترتيبية لا معلمية nonparametric ordinal data فقد تم التعبير عنها بتكرارات حدوث الإصابة، وتم تقييمها بالاختبار الإحصائي Kruskal-Mann Whitney wallis test متبوعاً باختبار Mann Whitney. عين مستوى الدلالة الإحصائية عند $P < 0.05$ حيث:

أما مجموعة الفانكوميسين التي حدثت فيها الأذية الكلوية فقد ظهرت بحجم أكبر من كلى المجموعة الشاهدة وظهرت القشرة الكلوية بلون زهري شاحب مائلة إلى الأبيض، واللبن أيضا كان بلون زهري ولم تلاحظ فيه الأعمدة الكلوية مع وجود وذمة واضحة كما هو موضح في الشكل 2

لوحظ في كلية جرذان مجموعة الفيتامين A تحسن واضح في التغيرات المورفولوجية العيانية، فقد كان حجمها أصغر من الكلية المرضية ولون القشرة واللبن أصبح قريب إلى الأحمر مع نقص الوذمة التي وجدت عند المجموعة المرضية، كما هو موضح في الشكل 2

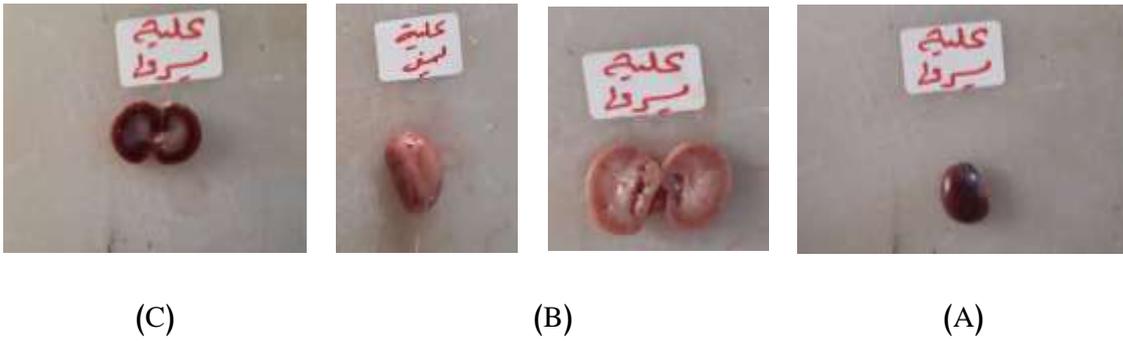
* $P < 0.05$ دليل وجود فارق إحصائي جوهري.
 ** $P < 0.005$ دليل وجود فارق إحصائي جوهري هام.
 *** $P < 0.001$ دليل وجود فارق إحصائي جوهري شديد الأهمية.

النتائج:

التغيرات المورفولوجية العيانية

morphological macroscopic changes

ظهرت كلى جرذان المجموعة الشاهدة الطبيعية بمظهر عياني طبيعي وكانت محاطة بمحفظة سهلة الإزالة ولها سطح أملس بني محمر، وأظهرت المقاطع الطولية القشرة الكلوية ذات اللون الأحمر واللبن الكلوي ذو اللون البني المحمر والمقسوم إلى أعمدة كلوية كما هو موضح في الشكل 2

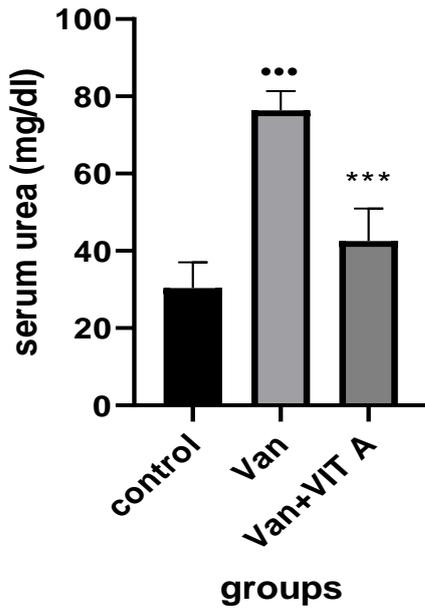


الشكل (2): التغيرات المورفولوجية العيانية في الكلية عند المجموعة الشاهدة (A)، المرضية (B)، الوقائية (C).

نسبة وزن الكلية إلى وزن الجسم (%)

Kidney weight / body weight ratio

كانت نسبة وزن الكلية الى وزن الجسم عند جرذان المجموعة الشاهدة ضمن الحدود الطبيعية. بينما ارتفع منسب وزن الكلية / وزن الجسم % عند جرذان مجموعة الفانكوميسين وذلك بفارق إحصائي جوهري شديد الأهمية ($P < 0.001$) مقارنة مع المجموعة الشاهدة الطبيعية. وانخفض المنسب عند جرذان مجموعة الفيتامين A بفارق إحصائي جوهري شديد الأهمية ($p < 0.001$) مقارنة مع مجموعة الفانكوميسين، كما هو موضح في الشكل 3.

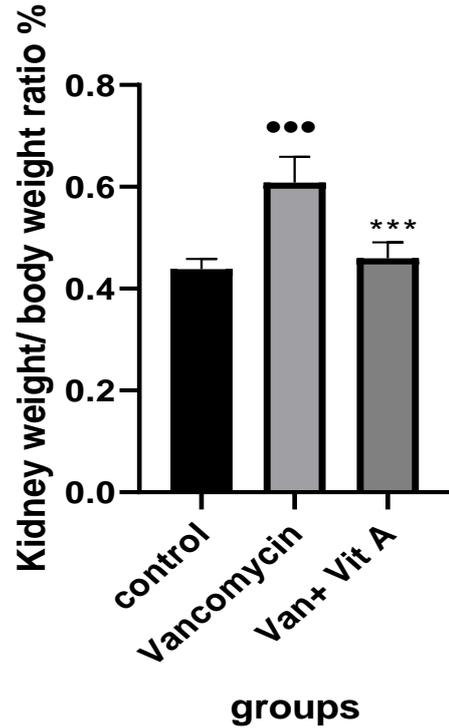


الشكل(4): تأثير كل من الفانكومايسين و فيتامين A على تركيز اليوريا المصلية، حيث يدل (***) على وجود فرق احصائي جوهري شديد الأهمية مقارنة مع المجموعة الشاهدة الطبيعية ($P<0.001$)، ويدل (***) على وجود فرق احصائي جوهري شديد الأهمية مقارنة مع المجموعة المرضية ($P<0.001$)

فحص أكسدة الدهون

Assay of lipid peroxidation (TBARS)

كانت الجرذان في المجموعة الشاهدة تمتلك مستويات MDA طبيعية. أدى حقن الفانكومايسين في المجموعة الثانية إلى ازدياد ملحوظ في مستويات MDA لديها وذلك بفارق احصائي جوهري شديد الأهمية ($P<0.001$) مقارنة مع المجموعة الشاهدة. وانخفضت مستويات MDA في مجموعة الفيتامين A بفارق احصائي جوهري شديد الأهمية ($p < 0.001$) مقارنة مع مجموعة الفانكومايسين كما هو موضح في الشكل 5.



الشكل(3): تأثير كل من الفانكومايسين و فيتامين A على تغير منسب وزن الكلية/وزن الجسم المنوية حيث يدل (***) على وجود فرق احصائي جوهري شديد الأهمية مقارنة مع المجموعة الطبيعية ($p < 0.001$)، كما يدل (***) على وجود فرق إحصائي جوهري شديد الأهمية مقارنة مع المجموعة المرضية ($p < 0.001$).

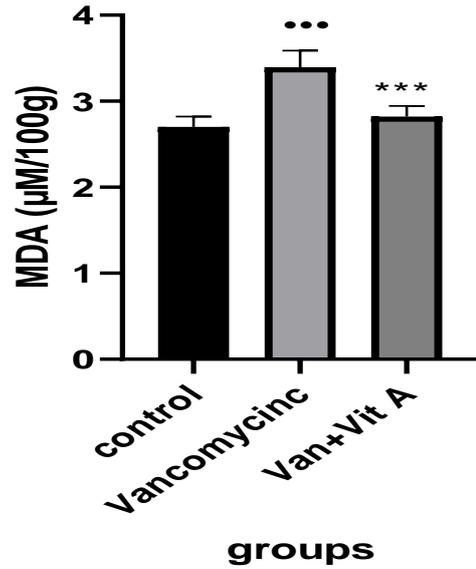
مقايسة اليوريا في المصل

Determination of serum urea

كانت مستويات اليوريا المصلية ضمن الحدود الطبيعية لدى جرذان المجموعة الشاهدة. بينما لوحظ ارتفاع مستويات اليوريا المصلية في مجموعة الفانكومايسين بشكل جوهري شديد الأهمية مقارنة مع المجموعة الشاهدة الطبيعية ($p < 0.001$)، وانخفضت مستويات اليوريا المصلية عند جرذان مجموعة الفيتامين A بشكل جوهري شديد الأهمية مقارنة مع مجموعة الفانكومايسين ($P < 0.001$) كما هو موضح في الشكل 4.

من الترسبات المرضية. أخذت 4 من جرذان هذه المجموعة (57.15%) التصنيف 2 الذي يوافق وجود توسع نبيبي متوسط، بينما أخذ جرد واحد من هذه المجموعة (14.28%) التصنيف 3 الذي يوافق وجود توسع نبيبي واضح وشديد، وأخذ جرذان (28.57%) التصنيف 0 الذي يدل على عدم وجود أي توسع كما في الشكل 7

أما عند دراسة عينات الكلى لمجموعة الفانكومايسين تبين أن أحد جرذاتها (14.28%) وافق التصنيف 4 الذي يدل على وجود توسع أنبوبي شديد جداً، وحازت باقي جرذان هذه المجموعة (85.72%) على التصنيف 3 الذي يشير إلى وجود إصابة شديدة حسب المعيار النسيجي المستخدم في هذه الدراسة كما في الشكل 7 لوحظ فارق إحصائي جوهري شديد الأهمية ($P < 0.001$) حيث كانت قيمة P value = 0.0009 مقارنة مع نتائج المجموعة الشاهدة الطبيعية. فيما يتعلق بمجموعة فيتامين A وُجد أنّ خمسة جرذان (71.43%) وافقت التصنيف 2 الذي يشير لوجود توسع نبيبي متوسط، ووافق جرذان (28.57%) التصنيف 1 الذي يدل على وجود توسع نبيبي طفيف كما في الشكل 7 مع وجود فارق إحصائي جوهري شديد الأهمية ($P < 0.001$) حيث كانت P value = 0.0006 مقارنة مع مجموعة الفانكومايسين.



الشكل (5): تأثير كل من الفانكومايسين وفيتامين A على مستويات MDA في النسيج الكلوي لجرذان التجربة، حيث يدل (***) على وجود فارق إحصائي جوهري شديد الأهمية مقارنة مع المجموعة الطبيعية ($p < 0.001$) و (***) على وجود فارق إحصائي جوهري شديد الأهمية مقارنة مع المجموعة المرضية ($p < 0.001$).

الفحص النسيجي للكلى

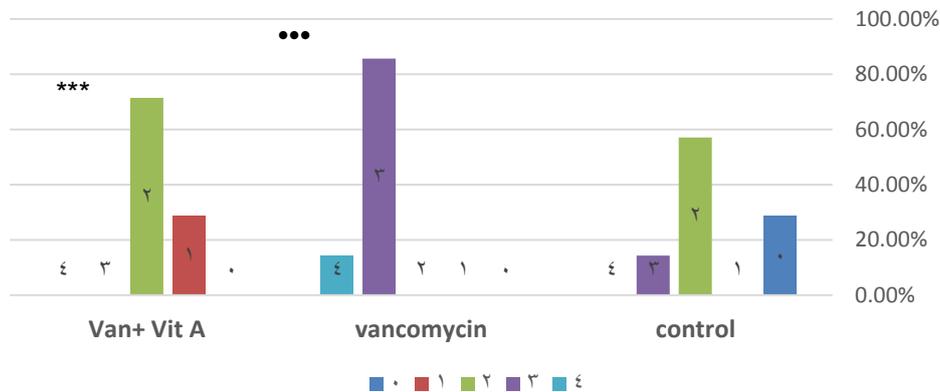
Histopathological examination of kidneys

التوسع النبيبي

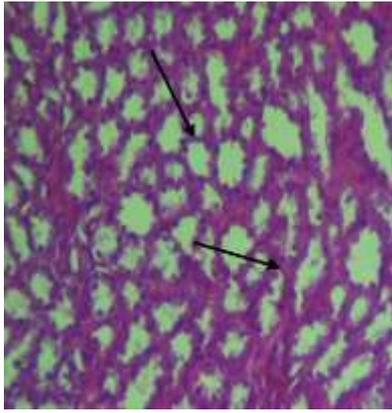
tubular dilatation

كانت النبيبات الكلوية في المجموعة الشاهدة مصطفة بانتظام، وحجم لمعتها طبيعياً إلى حد ما، ولكنها خالية تماماً

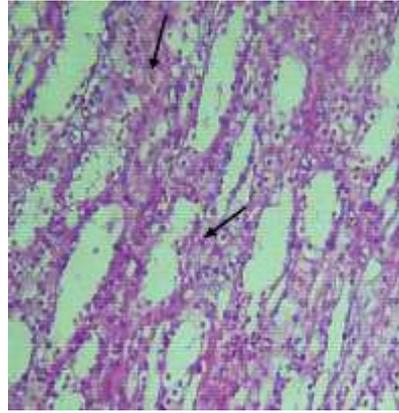
Tubular dilatation



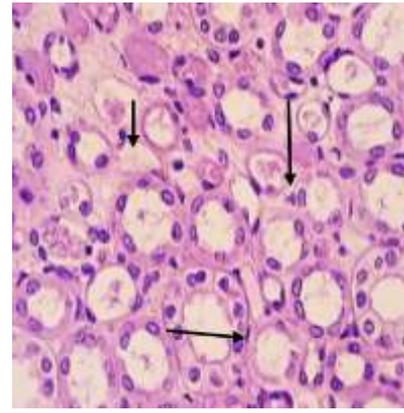
الشكل (6): تأثير فيتامين A على معلم التوسع النبيبي في نموذج للاعتلال الكلوي المحدث بالفانكومايسين عند جرذان التجربة، يدل الرمز (***) على وجود فارق إحصائي جوهري شديد الأهمية ($P < 0.001$) مقارنة مع المجموعة الشاهدة الطبيعية، كما يدل (***) على وجود فارق إحصائي جوهري شديد الأهمية ($P < 0.001$) مقارنة مع المجموعة الشاهدة المرضية.



(F)



(E)



(D)

الشكل (7): التوسع النببي Tubular dilatation في الكلى (بتلوين haematoxylin & eosin X40) في المجموعة الشاهدة (D) ، مجموعة الفانكوميسين (E) ، مجموعة الوقاية بفيتامين A (F) .

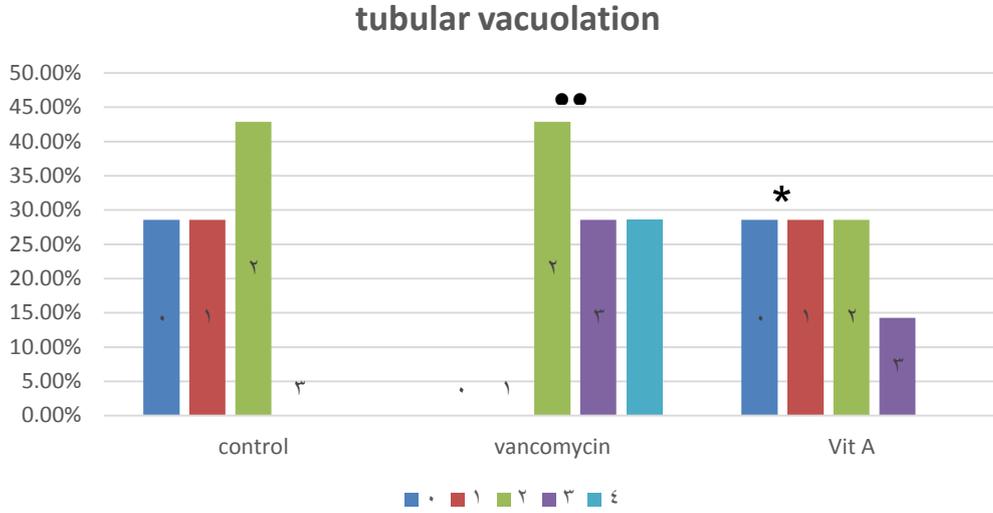
وعند مقارنة هذه النتائج مع جرذان مجموعة الشاهدة لوحظ فارق إحصائي جوهري هام وكانت $p \text{ value} = 0.0052$ ($p < 0.01$). بينما أخذ جرذ من جرذان مجموعة الفيتامين A (14.29%) التصنيف 3 الذي يشير إلى وجود تفجٍ نببي شديد، بينما حصل جرذان اثنان (28.57%) على التصنيف 0 وهذا يدل على عدم وجود أي إصابة، في حين أن جرذين آخرين (28.57%) حصلوا على التصنيف 1 الذي يشير إلى وجود تفجٍ نببي طفيف، وجرذين اثنين آخرين (28.57%) حصلوا على التصنيف 2 الذي يدل على تفجٍ نببي متوسط لديهما كما في الشكل 9

مع وجود فارق إحصائي جوهري عند مقارنة هذه النتائج مع نتائج مجموعة الفانكوميسين فكانت $p \text{ value} = 0.0118$ ($p < 0.05$).

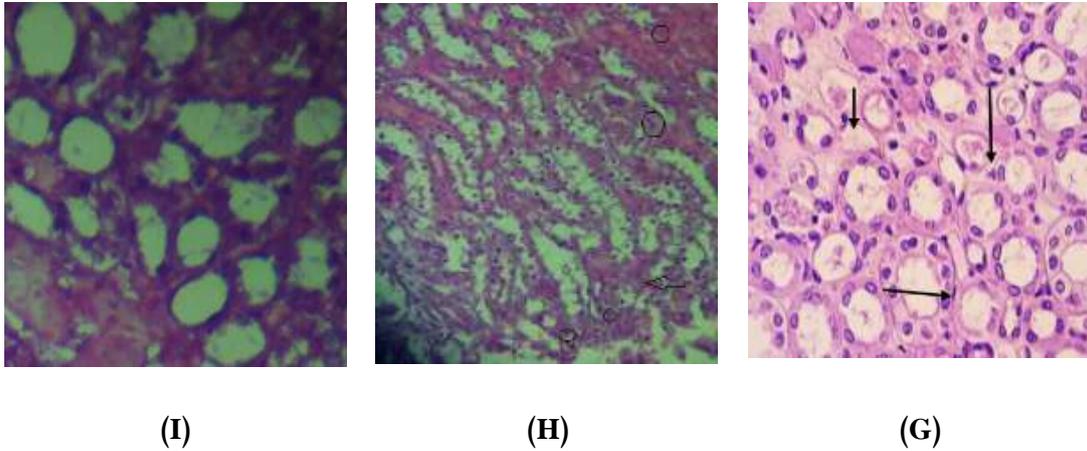
التفجي النببي

Tubular vacuolation

عند دراسة التفجي النببي في المجموعة الشاهدة الطبيعية، تبين أن جرذين (28.57%) قد وافقتا التصنيف 0 الذي يشير إلى عدم تشكل فجوات نببية، وجرذين آخرين (28.57%) قد وافقتا التصنيف 1 الذي يشير إلى تفجٍ نببي طفيف، وأن ثلاثة جرذان (42.86%) قد وافقت التصنيف 2 الذي يشير إلى وجود إصابة متوسطة كما في الشكل 9 أما في مجموعة الفانكوميسين تبين أن جرذين (28.57%) قد وافقتا التصنيف 3 الذي يشير إلى وجود تفجٍ نببي شديد، وأن جرذين آخرين (28.57%) قد وافقتا التصنيف 4 الذي يشير إلى إصابة شديدة جداً وتفجٍ نببي شديد جداً، وأن ثلاثة جرذان (42.86%) قد وافقت التصنيف 2 الذي يشير إلى وجود إصابة متوسط كما في الشكل 9.



الشكل (8): تأثير كل من فيتامين A والفاانكوميسين على معلم التفجّي النببي في نموذج للاعتلال الكلوي المحدث بالفاانكوميسين عند جرذان التجربة. يدل الرمز (**) على وجود فرق إحصائي جوهري هام ($P < 0.01$) مقارنة مع المجموعة الشاهدة الطبيعية. يدل الرمز (*) على وجود فرق إحصائي جوهري ($P < 0.05$) مقارنة مع المجموعة الشاهدة المرضية.



الشكل (9): التفجّي النببي Tubular vacuolation في الكلى (بتلوين haematoxylin & eosin X40) في المجموعة الشاهدة (G)، مجموعة الفاانكوميسين (H)، مجموعة الفيتامين A (A)

الجدول (1): المعالم المقاسة في مجموعات الدراسة المختلفة

Parameteres	Control group	VAN	VAN + Vit A
BUN (mg/dl)	30.36±2.53	76.37±1.89 ^a	42.57±3.16 ^c
MDA (µm/100g)	2.703±0.045	3.396±0.073 ^a	2.820±0.047 ^c
Grade of tubular dilatation & tubular vacuolation			
Grade 0	28.57%	0	0
Grade 1	0	0	28.57%
Grade 2	57.15%	0	71.43%
Grade 3	14.28%	85.72%	0
Grade 4	0	14.28%	0

VAN, vancomycin. Vit A, vitamin A. P^a<0.001 versus control group; P^c<0.001 versus vancomycin group.

المناقشة:

Discussion

الميتكوندريا وحرّض أكسدة الكارديوليبيين في غشائها وفعل كل من 7،-3،-9 Caspase، فانخفضت فعالية وحيوية الخلايا عندما كان تركيز VAN ≥ 2 Mm فازداد إنتاج Cytochrome C من الميتكوندريا الأمر الذي يحفز عملية الاستماتة في خلايا النيبب القريب (Sakamoto et al., 2017). ويُعدّ Malondialdehyde واحداً من النواتج النهائية لأكسدة الشحوم وهو مسؤول عن ضرر الغشاء الخلويّ عن طريق تغيير خواصه الداخلية كالانسايبيّة ونقل الشوارد والفعاليّة الإنزيميّة والارتباط بين البروتينات؛ وهذا قد ينتج عنه موت الخلية (Labudda, 2013) وقد تم قبوله كمؤشر على أكسدة الدهون والليبيدات في الأغشية الخلوية الناتجة عن الاجهاد التأكسدي. وقد أشارت الدراسات الى أن إعطاء الفانكوميسين عند حيوانات التجربة يزيد بشكل ملحوظ من مستويات البولة كما يزيد من مستويات MDA في النسيج الكلوي حسب دراسة Ilhami Celik وزملاؤه (Celik et al., 2005) ودراسة Toyoguchi T وزملاؤه (Toyoguchi et al., 1997) ودراسة Sabahattin Ocak وزملاؤه (Ocak et al., 1985-1990) ودراسة (al., 2007) وهذا يتوافق مع دراستنا فقد ارتفعت مستويات البولة وMDA في المجموعة المرضية بفارق احصائي جوهري شديد الأهمية (p<0.001) مقارنة مع المجموعة الشاهدة الطبيعية. تشير هذه النتائج إلى أن الإجهاد

تم الإبلاغ عن السمية الكلوية المرتبطة باستعمال الفانكوميسين في 5-25% من الحالات وارتفعت هذه النسبة عند مشاركتها مع صاد حيوي من زمرة الأمينوغليكوزيد (Iwamoto et al., 2003-876-8792) وقد ازداد عدد الدراسات المنشورة التي اهتمت بموضوع الأذية الكلوية التي يسببها الفانكوميسين ومحاولة إيجاد أدوية وقائية أو علاجية تحد/تخفف من هذه الأذية لأن الصاد الحيوي المدروس (فانكوميسين) لا يمكن الاستغناء عنه لأهميته في معالجة الانتانات المعقدة (Pais et al., 2020). يسبب الفانكوميسين (VAN) موت الخلايا المبرمج في الخلايا الظهارية للنبيب الكلوية الداني، ويحث المتقدرات على توليد فوق الأكاسيد (superoxide) مما يؤدي الى تعزيز عملية apoptosis في الخلايا، كما يزداد إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلي وعملية الأكسدة لفوسفوليبيدات غشاء الميتكوندريا والكارديوليبيين الغشائي Cardiolipin. (Sakamoto et al., 2017) ولقد قام (VAN) بتحريض عملية الاستماتة apoptosis في الخط الخلوي (LLC-PK1) وهو خط خلوي لخلايا ظهارية أنبوبية قريبة معزولة من كلية الخنازير، فقد رفع نسبة وجود جزيئات الأوكسجين التفاعلي داخل الخلايا وأزال استقطاب غشاء

تعتمد آلية فيتامين A كمضاد أكسدة على إيقاف فعالية جذور البيروكسيل Peroxyl radicals عن طريق التفاعل معها وإبطال تأثيرها وبالتالي كمنسها من الوسط قبل أن تقوم بأكسدة اللبيدات وتوليد هيدروبيروكسيدات Hydroperoxides وتم مقارنة فعالية هذه الآلية لكل من فيتامين A وفيتامين E فكان فيتامين A أكثر فعالية عندما يكون منشأ الجذور الحرة الطبقة المحبة للدهن وليس المائية وهذا يعود لتوضع سلسلة البوليين polyene الكارهة للماء لفيتامين A في الطبقة الليبيدية وهي التي تمتلك القدرة على التفاعل مع تلك الجذور، فيتفاعل فيتامين A معها ويشكل 5,6-retinoid epoxide مما يؤدي الى ثبات هذه الجذور وإخماد قدرتها على أكسدة الأغشية الخلوية. (Palace et al., 1999, 746-761). فتعود قدرة فيتامين A كمضاد أكسدة تعتمد على السلاسل الكارهة للماء polyenes حيث تستطيع إزالة فعالية O⁻ وكمنس جذور البيروكسيل ومنها الليوبيروكسل الموجودة في الأغشية الخلوية عن طريق التفاعل معها، وكلما كانت السلسلة أطول كان التفاعل أكبر وبالتالي تأثير مضاد للأكسدة أعلى (Palace et al., 1999, 746-761).

(Livrea and Tesoriere, 1998, 113-143)

يعتبر حمض الرتنويك عامل حماية للكلية في النماذج الحيوانية ضد أمراض الكلى بتعدد أسبابها وتعود الآليات الى تفعيل مسار cAMP/PKA pathway عن طريق الارتباط مع مستقبل RAR α في السيتوزول، ويزداد التعبير عن هذا المستقبل في الكبيبات والنبيبات القريبة والبعيدة (Elsayed et al., 2016, 327-337).

أيضا يمكن أن يرتبط حمض الريتنيويك (RA) مع بروتين RARRES1 (protein coding gene) الذي يشكل خطورة لأنه يفعل الموت المبرمج لخلايا الكبيبات واحداث الأذية فيها وبالتالي حدوث وتطور السمية الكلوية، ويتم تفعيله عندما تكون جرعة RA مرتفعة جدا وبالتالي نستنتج أن فيتامين A

التأكسدي هو المتسبب في إحداث السمية الكلوية المرتبطة باستخدام الفانكومايسين.

تم وصف التأثير المضاد للأكسدة لفيتامين A لأول مرة عن طريق (Monaghan and Schmitt, 1968-6235-6233). ثم تابع الأمر Burton and Ingold في عام 1984 ليقترحوا آلية فيتامين A في إخماد الجذور الحرة في أغشية الخلايا (Burton and Ingold, 1984-5731-569).

على الرغم من أن فيتامين A ليس من مضادات الأكسدة الشائعة إلا أن بعض الدراسات أشارت الى دور محتمل لفيتامين A كعامل مضاد للأكسدة غير مباشر، فمثلا قد ثبت أنه يلعب دور رئيسي في تثبيط تنشيط الخلايا النجمية الكبدية وبالتالي الوقاية من سرطان الكبد عن طريق تثبيط البروتين المتفاعل مع الثيوريدوكسين thioredoxin interacting protein (TXNIP) فقد وجد أن ATRA يؤثر في التعبير عن جينة مختلفة ومنها الجينة المعبرة عن (TXNIP) الذي يثبط فعالية مضادات الأكسدة للثيوريدوكسين thioredoxin (TRX) فقد قلل التعبير عن هذه الجينة وبالتالي زاد من فعالية مضادات الأكسدة الذاتية في هذا المسار (Shimizu et al., 2018-6162-607).

وقد ثبت عام 2016 بحسب دراسة Jung-Hwa Cha وزملاؤه أن فيتامين A يعدل نظام الأكسدة (بفعل مضاد أكسدة) لدى الجرذان وذلك عند استخدامه بجرعة 4000-8000 IU/Kg، أما الجرعات الأعلى من 20000 IU/Kg فقد أعطت تأثيراً معاكساً تماماً (مؤكسد) (Cha et al., 2016, 26-32). لذلك قمنا في دراستنا باختبار جرعة 4000 IU/Kg لدراستها من حيث تعديل الأذية المحدثة بالفانكومايسين. يعتبر فيتامين A جزيء نشط جداً في كمنس الجذور الحرة وعلى عكس باقي مضادات الأكسدة التي تمنع أكسدة الدهون فقط فإن فيتامين A يوقف شلال الأكسدة بشكل مباشر عن طريق التفاعل ومحاصرة الجذور الحرة. (Alpsoy et al., 2009, 121-127).

ركزت الدراسات السابقة مثل دراسة Sabahattin وزملاؤه (Ocak et al., 2007, 328-333) و Ilhami Celik وزملاؤه (Celik et al., 2005, 325-332) على النيبات الكلوية في الفحص النسيجي للكلية وذلك بكونها الموقع المستهدف الأول بالسمية الكلوية المحرصة بالفانكومايسين، حيث بدت النيبات غير طبيعية ومصابة وهذا يتوافق مع دراستنا حيث بدت النيبات متوسعة ومصابة كما لوحظ بداية تدرك للخلايا النيبية مقارنة مع نيبات سليمة ومنتظمة في المجموعة الطبيعية وكان هذا الاختلاف بفارق احصائي جوهري شديد الأهمية. وانخفضت هذه الإصابة الأنبوية عند مجموعة الفيتامين A مقارنة مع مجموعة الفانكومايسين وذلك بفارق احصائي جوهري مما يدل على التأثير الوقائي، ولا يوجد دراسات سابقة تطرقت إلى الدراسة النسيجية لفيتامين A في الكلية كي نقارن معها، فتعد هذه الدراسة هي الأولى من نوعها التي درست تأثير الفيتامين A على السمية الكلوية المحرصة بدواء الفانكومايسين.

الاستنتاج:

Conclusions

تشير نتائج دراستنا إلى فعالية إعطاء فيتامين A عن طريق الفم في التخفيف والوقاية من السمية الكلوية المحدثة بالفانكومايسين عند الجرذان وذلك من خلال تأثيراته المضادة للأكسدة القوية والمباشرة.

يزيد/ينقص السمية الكلوية اعتمادا على الجرعة المستخدمة (Chen et al., 2021, 683-692). حسب دراسة P mantilla وزملاؤه كان لاستخدام فيتامين A تأثير وقائي في الأذية المحدثة بدواء Adriamycin وكذلك دراسة Naheed Banu وزملاؤه على أدمغة الجرذان فقد انخفضت مستويات MDA مقارنة مع المجموعة المرضية، وهذا يتوافق مع دراستنا حيث انخفضت MDA لدى مجموعة الوقاية بفارق جوهري شديد الأهمية ($P < 0.001$) (Zaidi and Banu, 2004, 86-93; Montilla et al., 1998, 229-233). تخالفت دراستنا مع دراسة Kavukcu وزملاؤه (Kavukcu et al., 2001, 689-690) حيث أدى استخدام فيتامين A إلى زيادة التلف الكلوي وأيضا دراسة Carlos وزملاؤه وبعزى هذا الاختلاف إلى استخدام جرعات عالية 12500/25000 IU/kg/day من فيتامين A فلوخط تحريض شدة تأكسدية في الرحم والمبايض عند جرذان اناث (Schnorr et al., 2011, 2645-2654).

أظهرت دراسة Cem Yucel وزملاؤه خفض فيتامين A لمستويات البولة عند جرذان أحدثت لديهم أذية كلوية باستخدام cisplatin (Yucel et al., 2019, 164-159) وهذا يتوافق مع دراستنا حيث خفض استخدام فيتامين A مستوى البولة بفارق احصائي جوهري شديد الأهمية ($P < 0.001$).

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

References:

1. ALPSOY, L., YILDIRIM, A. & AGAR, G. 2009. The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Toxicology and industrial health*, 25, 121-127.
2. ALVAREZ, R., VAZ, B., GRONEMEYER, H. & DE LERA, A. R. 2014. Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chemical reviews*, 114, 1-125.
3. BEETON, C., GARCIA, A. & CHANDY, K. G. 2007. Drawing blood from rats through the saphenous vein and by cardiac puncture. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e266.
4. BURTON, G. W. & INGOLD, K. 1984. Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569-573.
5. CELIK, I., CIHANGIROGLU, M., ILHAN, N., AKPOLAT, N. & AKBULUT, H. H. 2005. Protective effects of different antioxidants and amrinone on vancomycin-induced nephrotoxicity. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 97, 325-332.
6. CHA, J.-H., YU, Q.-M. & SEO, J.-S. 2016. Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats. *Nutrition research and practice*, 10, 26-32.
7. CHEN, A., LIU, Y., LU, Y., LEE, K. & HE, J. C. 2021. Disparate roles of retinoid acid signaling molecules in kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 320, F683-F692.
8. CONAWAY, H. H., HENNING, P. & LERNER, U. H. 2013. Vitamin A metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. *Endocrine reviews*, 34, 766-797.
9. ELSAYED, A. M., ABDELGHANY, T. M., AKOOL, E.-S., ABDEL-AZIZ, A.-A. H. & ABDEL-BAKKY, M. S. 2016. All-trans retinoic acid potentiates cisplatin-induced kidney injury in rats: impact of retinoic acid signaling pathway. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 389, 327-337.
10. ELYASI, S., KHALILI, H., HATAMKHANI, S. & DASHTI-KHAVIDAKI, S. 2013. Prevention of vancomycin induced nephrotoxicity: a review of preclinical data. *European journal of clinical pharmacology*, 69, 747-754.
11. FILIPPONE, E. J., KRAFT, W. K. & FARBER, J. L. 2017. The nephrotoxicity of vancomycin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 102, 459-469.
12. FOOTE, C. S. & DENNY, R. W. 1968. Chemistry of singlet oxygen. VII. Quenching by beta-carotene. *Journal of the American Chemical Society*, 90, 6233-6235.
13. HORI, Y., AOKI, N., KUWAHARA, S., HOSAJIMA, M., KASEDA, R., GOTO, S., IIDA, T., DE, S., KABASAWA, H. & KANEKO, R. 2017. Megalin blockade with cilastatin suppresses drug-induced nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28, 1783-1791.
14. IWAMOTO, T., KAGAWA, Y. & KOJIMA, M. 2003. Clinical efficacy of therapeutic drug monitoring in patients receiving vancomycin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26, 876-879.
15. KAVUKCU, S., TURKMEN, M. A. & SOYLU, A. 2001. Could the effective mechanisms of retinoids on nephrogenesis be also operative on the amelioration of injury in acquired renal lesions? *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 16, 689-690.
16. KHERADMAND, A., ALIREZAEI, M., ASADIAN, P., RAFIEI ALAVI, E. & JOORABI, S. 2009. Antioxidant enzyme activity and MDA level in the rat testis following chronic administration of ghrelin. *Andrologia*, 41, 335-340.
17. KING, D. & SMITH, M. 2004. Proliferative responses observed following vancomycin treatment in renal proximal tubule epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 18, 797-803.
18. LABUDDA, M. 2013. Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding.

19. LIVREA, M. A. & TESORIERE, L. 1998. Antioxidant activity of vitamin A within lipid environments. *Fat-Soluble Vitamins*, 113-143.
20. MONTILLA, P. L., TÚNEZ, I. F., DE AGUEDA, C. M., GASCÓN, F. L. & LÓPEZ SORIA, J. V. 1998. Protective role of melatonin and retinol palmitate in oxidative stress and hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin in rats. *Journal of pineal research*, 25, 86-93.
21. OCAK, S., GORUR, S., HAKVERDI, S., CELIK, S. & ERDOGAN, S. 2007. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester, vitamin C, vitamin E and N-acetylcysteine on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 100, 328-333.
22. PAIS, G. M., LIU, J., ZEPKAN, S., AVEDISSIAN, S. N., RHODES, N. J., DOWNES, K. J., MOORTHY, G. S. & SCHEETZ, M. H. 2020. Vancomycin-induced kidney injury: animal models of toxicodynamics, mechanisms of injury, human translation, and potential strategies for prevention. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 40, 438-454.
23. PALACE, V. P., KHAPER, N., QIN, Q. & SINGAL, P. K. 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 746-761.
24. SAKAMOTO, Y., YANO, T., HANADA, Y., TAKESHITA, A., INAGAKI, F., MASUDA, S., MATSUNAGA, N., KOYANAGI, S. & OHDO, S. 2017. Vancomycin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis via mitochondrial cardiolipin peroxidation in renal tubular epithelial cells. *European journal of pharmacology*, 800, 48-56.
25. SCHNORR, C. E., MORRONE, M. D. S., WEBER, M. H., LORENZI, R., BEHR, G. A. & MOREIRA, J. C. F. 2011. The effects of vitamin A supplementation to rats during gestation and lactation upon redox parameters: increased oxidative stress and redox modulation in mothers and their offspring. *Food and chemical toxicology*, 49, 2645-2654.
26. SHIMIZU, H., TSUBOTA, T., KANKI, K. & SHIOTA, G. 2018. All-trans retinoic acid ameliorates hepatic stellate cell activation via suppression of thioredoxin interacting protein expression. *Journal of cellular physiology*, 233, 607-616.
27. TOYOGUCHI, T., TAKAHASHI, S., HOSOYA, J., NAKAGAWA, Y. & WATANABE, H. 1997. Nephrotoxicity of vancomycin and drug interaction study with cilastatin in rabbits. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41, 1985-1990.
28. YUCEL, C., YUCEL, E. E., ARSLAN, F. D., EKMEKCI, S., KISA, E., ULKER, V., UCAR, M., ILBEY, Y. O., CELIK, O. & BASOK, B. I. 2019. All-trans retinoic acid prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 392, 159-164.
29. ZAIDI, S. K. R. & BANU, N. 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica chimica acta*, 340, 229-233.

