

УСПОРАВАЊЕ ПРОГРЕСИЈЕ ХРОНИЧНЕ ИНСУФИЦИЈЕНЦИЈЕ БУБРЕГА КАПТОПРИЛОМ КОД ПАЦОВА СА СПОНТАНОМ АРТЕРИЈСКОМ ХИПЕРТЕНЗИЈОМ И АДРИАМИЦИНСКОМ НЕФРОПАТИЈОМ

Дијана Б. ЈОВАНОВИЋ¹, Ђурђица ЈОВОВИЋ², Јасмина ВАРАГИЋ²,

Јован ДИМИТРИЈЕВИЋ¹, Зорица ДРАГОЈЛОВИЋ³, Љубица БУКАНОВИЋ¹

1. Нефролошка Клиника Клиничког центра Србије, Београд; 2. Институт за медицинска истраживања, Београд 3. Медицинска биохемија Клиничког центра Србије, Београд;

КРАТАК САДРЖАЈ: Утицај артеријске хипертензије на прогресију хроничне инсуфицијенције бубрега описан је у бројним експерименталним и клиничким студијама. Самим тим, утицај различитих антихипертензивних лекова ка регулисању притиска крви и успоравању прогресије хроничне инсуфицијенције бубрега још увек је предмет расправа и неслагања многих научника. Циљ овог рада био је да се испита утицај каптоприла на клиничке, биохемијске и морфолошке промене код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом и нефропатијом изазваном адриамицином. Шездесет и девет женки пацова са спонтаном артеријском хипертензијом (старе 24 недеље) сврстане су у три групе: 1. контролна група - 12; 2. група с нефропатијом изазваном адриамицином - 27 са спонтаном артеријском хипертензијом која је третирана адриамицином (2 mg/kg i.v. два пута у 20 дана); 3. група с нефропатијом изазваном адриамицином - група С: 30 са спонтаном артеријском хипертензијом третирана адриамицином и каптоприлом (60 mg/kg дневно). Систолни притисак крви мерен је на две недеље, а анализе серума и урина на почетку студије и у 6-ој, 12. и 18. недељи после друге инјекције адриамицина. Животиње су жртвоване 6-е, 12. и 18. недеље од почетка третирања каптоприлом. Патоморфолошке промене приказане су семиквантитативно израчунавањем индекса гломерула, васкуларног индекса, као и индекса фиброзе интерстицијума и инфилтрације, и атрофије тубула. Каптоприл је нормализовао системски притисак крви, али није смањио протеинурију код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом. Уреја и креатинин у серуму прогресивно су расли у свим испитиваним групама пацова, али брже код пацова који су третирани адриамицином. Клиренс креатинина најбрже је опадао у групи код пацова с нефропатијом изазваном адриамицином. Каптоприл смањује промене у гломерулима код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом и нефропатијом изазваном адриамицином с високом статистичком значајношћу у 18-ој недељи студије. Промене у интерстицијуму код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом који су третирани адриамицином увећавају се у току огледа, али статистички значајно спорије у свим недељама студије у групи пацова с нефропатијом изазваном адриамицином (група С). Каптоприл није утицао на промене у тубулима код ових животиња.

Кључне речи: бубрег, хронична инсуфицијенција, пацови са спонтаном хипертензијом, адриамицинска нефропатија. (СРП АРХ ЦЕЛОК ЛЕК).

УВОД

Утицај артеријске хипертензије ка прогресији хроничне инсуфицијенције бубрега описали су још 1914. године Фолхард и Фар (*Volhard* и *Fabr*) [1], касније 1940. године Риц (*Ritz*) и сарадници [2], а затим се у многим студијама описује утицај различитих антихипертензивних лекова ка регулисању притиска крви и успоравању прогресије хроничне инсуфицијенције бубрега. Бројне експерименталне и клиничке студије посебно наглашавају да инхибитори конвертирајућег ензима ангиотензина као лекови регулишу како гломерулску, тако и системску артеријску хипертензију, док је њихово дејство ка успоравању прогресије хроничне инсуфицијенције бубрега још увек предмет расправа и неслагања многих научника [2-14].

Циљ ове студије био је да се испита дејство каптоприла на клиничке, биохемијске и морфолошке промене код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом и нефропатијом изазваном адриамицином.

МЕТОД РАДА

Експерименталне животиње

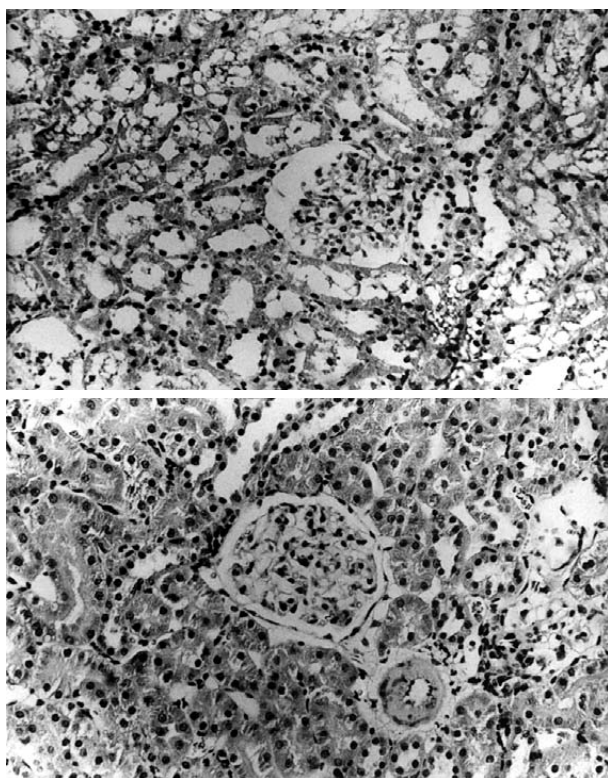
У студији су коришћене женке пацова, старе 24 недеље, са спонтаном артеријском хипертензијом (СХР), тежине око 200 g, одгојене у Институту за медицинска истраживања у Београду. Пацови за овај рад одабрани су из шеснаесте и седамнаесте генерације потомака оригиналних пацова овог соја, добијених од *Tanconic Farms, Germantown, N.Y., USA*.

Животиње су храњене стандардном храном за лабораторијске пацове (Ветеринарски завод, Земун) и текућом (водоводском) водом. Укупно је обрађено 69 животиња које су сврстане у следеће групе: контролну групу чинило је 12 пацова са спонтаном артеријском хипертензијом који су користили текућу воду за пиће. Преосталих 57 животиња добиле су 2 mg/kg адриамицина у феморалну вену, два пута у размаку од 20 дана. После друге инјекције животиње су подељене у две групе: адриамицинску групу од 27 животиња, које су добијале чесмену воду за пиће, и адриамицин-каптоприлску групу од 30 животиња, које су добијале каптоприл растворен у води за пиће (1 g/L). Рачунајући на просечни унос воде, доза каптоприла је била 60 mg/kg .

Животиње су испитиване до 18-е недеље после друге инјекције адриамицина (укупно 22 недеље). Систолни притисак крви мерен је на две недеље током испитивања. Притисак је регистрован у артерији у репу неанестезисаних пацова, модификацијом метода Мајстрело (*Maistrello*) и Мачера (*Matscher*) [15], из 1969. године, употребом гумене манжетне. У следећим недељама, 4-ој, 6, 12. и 18. животиње су стављане у тзв. метаболичке кавезе у којима је скупљан урин, испод парафинског уља, у току 24 сата. Узорци крви узимани су пункцијом срца код пацова анестезисаних етром, управо после завршетка скупљања мокраће. Мерење су концентрације уреје и креатинина у серуму и урину, и протеини у урину и то: уреја у серуму и урину испитивана је ензимским методом (уреаза/глутамат-дехидрогеназа); креатинин у серуму и урину Цефевом реакцијом; протеини у урину методом *Coomassie brilliant blue*.

Морфолошке студије

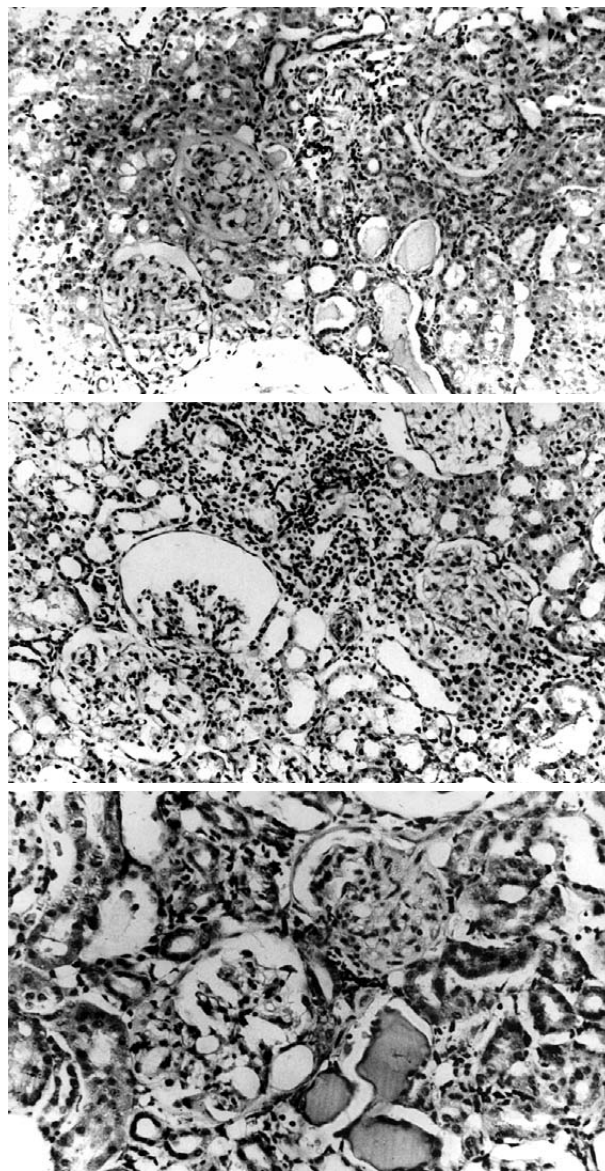
Пацови су жртвовани у 6-ој, 12. и 18. недељи после друге инјекције адриамицина, и оба бубрега су стављана у неутрални, пуферовани, формалински раствор (10-процентни). После фиксације, ткиво је укалупљено у парафин и сечено на дебљину од 4 mm. После тога су примењена следећа хистохемијска бојења: хематоксилин-еозин, *Periodic acid Schiff (PAS)*, *Trichrom Masson* и *Silver methanamin* по Џонсу. Хистолошке препарате испитивао је светлосним



СЛИКА 1: Патохистолошке промене код СХР
 а) Нормоцелулни гломерул с благом дилатацијом лумена појединих капилара који садрже ретке елементе ћелија крви; појединачна дегенерација и некроза епителиалних ћелија тубула (хематоксилин-еозин; 150 x); б) Гломерули показују минималне промене с благом задебљањем матрикса мезангијума; сужен лумен мање артерије услед хијалинозе зида (пролиферација интимае и медије) (хематоксилин-еозин; 150 x)

FIGURE 1. Pathohistological changes in SHR:
 a) Normocellular glomeruli with moderate lumen dilatation of some capillaries containing rare blood elements; degeneration and necrosis of individual epithelial cells (Haematoxilin eosin; 150 x); b) The glomeruli show minor changes with slight widening of the mesangial stalk region; narrowed lumen of arterial blood vessel with hyalinosis of arterial wall (proliferation of intimaе and mediae) (Haematoxilin eosin; 150 x)

микроскопом патолог, који претходно није имао увид у групе пацова. На сваком хистолошком препарату прегледано је најмање 60 гломерула, а семиквантитативни резултат је коришћен за процену како промена у гломерулима, тако и промена у крвним судовима, тубулима и интерстицијуму на следећи начин: индекс гломерула одређиван је према методу Кусумото и сарадника [16], према коме је сваки гломерул класификован у једну од четири категорије, означене

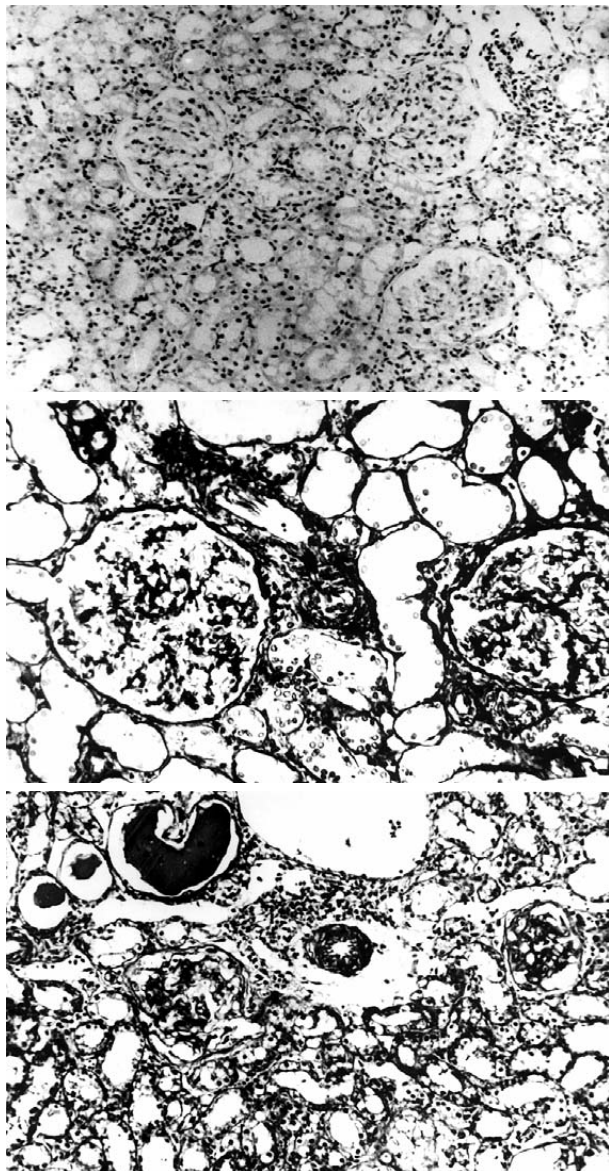


СЛИКА 2. Патохистолошке промене код АDR СХР:
 а) Слабо изражена хиперцелулност гломерула с благом фокусном фиброзом и мононуклеарном инфилтрацијом ћелијама; понеки крвни судови с благом пролиферацијом интимае и медије (хематоксилин-еозин; 150 x); б) Пролиферација морфолошких елемената зида артериола око којих је изражен мононуклеарни целулни инфилтрат (хематоксилин-еозин; 200 x); в) Гломерули показују сегментну пролиферацију и фибрилне крешчендо-формације; фокусна дилатација тубула и некроза епителних ћелија садржајем протеина у лумену (хематоксилин-еозин; 200 x)

FIGURE 2. Pathohistological changes in ADR SHR:
 a) Slight glomerular hypercellularity with moderate focal fibrosis and mononuclear cellular infiltration; some blood vessels have mild proliferation of intimaе and mediae (Haematoxilin eosin; 150 x); b) Proliferation of arterial wall elements surrounded with mononuclear cells (Haematoxilin eosin; 200 x); c) The glomeruli show segmental proliferation and increased fibrillar matrix of a tuft adherent to a fibrocellular crescent; focal tubular dilatation and epithelial necrosis with protein staph in lumen (Haematoxilin eosin; 200 x)

одговарајућим индексом: нула - непромењен гломерул; два - гломерул са сегментном склерозом која обухвата мање од 20 посто мезангијума; пет - гломерул с 20-50 посто склерозе мезангијума; десет - потпуно склерозирани гломерул. Просечан индекс гломерула је сматран као индекс гломерула за тај препарат.

Васкуларни индекс је одређиван према методу Бадер-Мајер [17]. Промене у зидовима артериола класификоване



СЛИКА 3. Патохистолошке промене код ADR-C SHR: а) Гломерули с благо повећаним матрикса мезангијума; слабо израчена фиброза и мононуклеарна целуларна инфилтрација у интерстицијуму (хематоксилин-еозин; 150 x); б) Умерено изражен мезангијски матрикс с пролиферацијом мезангијских ћелија гломерула; крвни судови суженог лумена с пролиферацијом интимае и медије и благом склерозом (сребро-метанаминам - Jones; 300 x); с) Гломерулска хиперцелуларност с увећањем мезангијског матрикса; фокусна дилатација тубула с протеинским садржајем у лумену; сужен лумен интерлобуларне артерије са значајном склерозом (Trichrom Masson; 150 x).

FIGURE 3: Pathohistological changes in ADR-C SHR: а) Glomeruli with slight increase of mesangial matrix; slight interstitial fibrosis and mononuclear cellular infiltrations (Haematoxylin eosin; 150 x); б) Moderate proliferation of mesangial matrix with proliferation of mesangial glomerular cells; blood vessels with narrowed lumen and proliferation of intimaе and mediae with mild sclerosis (Silver methanamine - Jones; 300 x); с) Glomerular hypercellularity with proliferation of mesangial matrix; focal tubular dilatation with protein staph in lumen; narrowed lumen of interlobular artery with marked sclerosis (Trichrom Masson; 150 x).

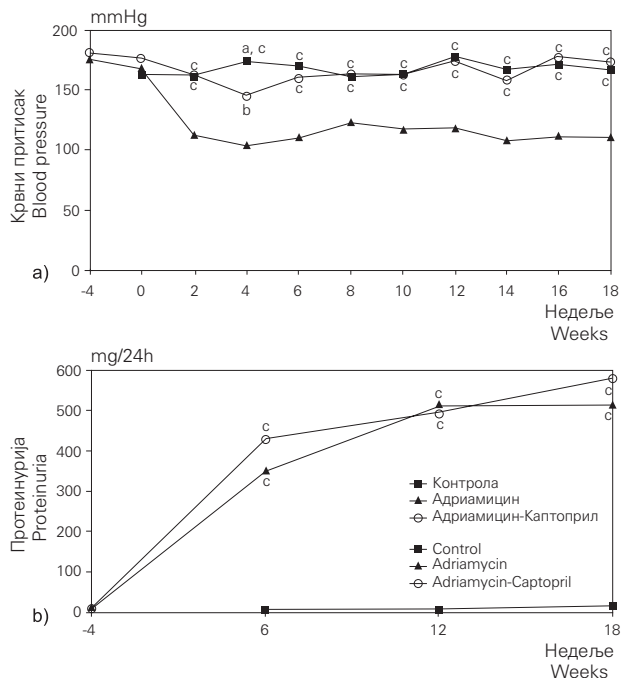
су у четири степена: први- непромењени крвни судови; други - крвни судови с мање од 50 посто хијалинозе зида; трећи - крвни судови с хијалинозом зида преко 50 посто, а мањом од 100 посто; четврти - крвни судови с хијалинозом целог зида и суженим луменом. Просечан индекс добијен је сабирањем производа броја крвних судова с одговарајућим индексом и дељењем одговарајућим бројем крвних судова. Добијени просечни резултат сматран је васкуларним индексом за тај препарат.

Промене у тубулоинтерстицијуму семиквантитативно су представљене индексима фиброзе интерстицијума, инфилтрације интерстицијума и атрофије тубула [18]. Фиброза интерстицијума класификована је у четири степена: нула - непромењен интерстицијум; два - фиброза интерстицијума мања од 20 посто у видном пољу; пет - фиброза интерстицијума већа од 20 посто у видном пољу; десет - фиброза интерстицијума преко 40 посто. Инфилтрација интерстицијума, односно атрофија тубула, изражавана је следећим индексима: нула - без промена; један - промене мање од 20 посто; два - промене веће од 20 посто; три - промене веће од 40 посто.

Појединачни резултати приказани су у табелама и графички као аритметичка средина (X) плус-минус стандардна девијација (SD). С обзиром на тип података, за статистичку анализу коришћени су параметарски тестови: т-тест за спарена и независна обележја и једносмерна анализа варијансе.

РЕЗУЛТАТИ

Промена притиска крви код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом у све три групе приказана је графиком 1-а. Каптоприл добро регулише притисак крви код пацова са спонтаном артеријском хи-



ГРАФИКОН 1. Промене систолног крвног притиска (а) и протеинурије (б) код свих испитаних група пацова

а) а - $p < 0.01$ у поређењу с групом АДР
 б, с - $p < 0.01$; $p < 0.001$ у поређењу с АДР- групом С
 в) с - $p < 0.001$ у поређењу с контролном групом

FIGURE 1. Changes in systolic blood cpressure (а) and urinary protein (б) in all studied groups of rats.

а) а - $p < 0.01$ in relation to ADR group
 б, с - $p < 0.01$; $p < 0.001$ in relation to ADR-C group
 в) с - $p < 0.001$ in relation to control group

пертензијом и с нефропатијом изазваном адриамицином, и то с високо статистички значајном разликом у односу на друге две испитиване групе животиња које нису третиране каптоприлом ($p < 0,001$), али не смањује протеинурију (Графикон 1-*b*).

Аритмеричке средине концентрација уреје и креатинина у серуму постепено расту у свим испитиваним групама, али брже у групама животиња које су третиране адриамицином (Табела 1). Промена клиренса креатинина у контролној групи животиња није значајна.

Опадање клиренса креатинина у адриамицинско-каптоприлској групи спорије је него у адриамицинској групи животиња, али без статистичке значајности.

Од 69 обрађених животиња на почетку студије, 16 је угинуло за време испитивања. Остале животиње жртвоване су у 6-ој, 12. и 18. недељи огледа, а њихове патохистолошке промене у бубрезима, као и гломерулски, васкуларни, и тубулоинтерстицијски индекси приказани су у табели 2.

У контролној групи пацова минималне промене на гломерулима и у интерстицијуму примећују се тек у 18-ој недељи студије (Табела 2, Слика 1-*b*). Лакше промене у тубулима откривају се у 12-ој и 18. недељи огледа (Табела 2, Слика 1), али су промене на крвним судовима изражене, како у 12-ој (Слика 1-*a*), тако и у 18. недељи, када су и статистички значајно веће него у групама које су третиране адриамицином (Слика 1-*b*, Табела 2).

Промене у гломерулима, тубулима и у интерстицијуму су највеће у адриамицинској групи пацова и погоршавају се у току огледа (Табела 2, Слика 2-*a,b,c*). У адриамицинско-каптоприлској групи пацова промене у гломерулима се погоршавају у току огледа, али су у свим недељама слабије изражене него у адриамицинској групи животиња (Табела 2). Исто је и с променама у интерстицијуму (Табела 2, Слика 3-*a,b,c*). Промене у гломерулима и у интерстицијуму су статистички значајно мање у 18-ој недељи огледа у адриамицинско-каптоприлској групи животиња него у адриамицинској групи (Табела 2, Слика 2-*c*, Слика 3-*c*). Промене у тубулима и васкуларне промене су само у 6-ој недељи слабије изражене код адриамицинско-каптоприлске групе него у адриамицинској групи, али се ова разлика у каснијем току болести губи.

ДИСКУСИЈА

Ричард Брајт (*Richard Bright*) је вероватно први који је описао да су болести бубрега удружене с променама кардиоваскуларног система, хипертрофијом леве коморе срца и артеријском хипертензијом још 1827. године [1]. Фолхард (*Volhard*) и Фар и (*Fahr*) 1914. године указују да је артеријска хипертензија главни узрок прогресивног губитка функције бубрега у хроничним болестима бубрега [1, 2]. Касније, многи аутори у својим експерименталним и клиничким студијама описују дејство различитих антихипертензивних лекова ка регулисању притиска крви и успоравању прогресије хроничне инсуфицијенције бубрега. У експерименталним студијама коришћени су различити

експериментални модели прогресивне хроничне инсуфицијенције бубрега [1, 8,19-21].

С појавом лекова инхибитора конвертирајућег ензима ангиотензина и првих радова који указују да они боље успоравају прогресију хроничне инсуфицијенције бубрега, бројни аутори проучавају дејство ових лекова како на регулацију системске, тако и гломерулске артеријске хипертензије и успоравање прогресије хроничне инсуфицијенције бубрега. Андерсон, Ренке (*Rennke*) и Бренер (*Brenner*) проучавали су дејство “трипл-терапије” (резерпин, хидралазин, хидрохлоротиазид) и инхибитора конвертирајућег ензима ангиотензина (еналаприл) код пацова са супроталном нефректомијом [3]. Еналаприл снижава системску и гломерулску артеријску хипертензију и смањује протеинурију и склерозу гломерула [9, 22-24], док “трипл терапија” и поред тога што снижава системску артеријску хипертензију, не снижава артеријску хипертензију гломерула, нити смањује оштећење гломерула [25], што је случај и на моделу уни-нефректомисаних пацова *DOCA* [26]. И Раи (*Raij*) и сарадници [27] описују код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом и супроталном аблацијом бубрега боље дејство еналаприла него “трипл-терапија”: еналаприл редукује експанзију мезангијума и протеинурију. Само мањи број аутора, на челу с Дворкином (*Dworkin*), није потврдио да инхибитори конвертирајућег ензима ангиотензина ефикасније успоравају прогресију хроничне инсуфицијенције бубрега [5]. Наша студија [8], као и многи други аутори [3, 25, 26], указује да инхибитор конвертирајућег ензима ангиотензина, каптоприл, више успорава

ТАБЕЛА 1. Клиренс уреје, креатинина у свим испитиваним групама животиња

TABLE 1. Urea, creatinine and creatinine clearance in all examined groups

Недеље Week	Контролна група Control group	ADR група ADR group	ADR-C група ADR-C group	Статистичка значајност Statistical sig.
Уреја Urea				
0	.	7.02 ± 1.27	7.68 ± 1.92	ns
6	6.66 ± 0.23	7.34 ± 1.55	6.66 ± 3.32	ns
12	7.70 ± 0.77	8.67 ± 5.02	11.67 ± 4.35	1:3 - b
18	8.60 ± 1.76	10.23 ± 2.78	12.83 ± 4.84	1:3 - a
Креатинин Creatinine				
0	.	38.50 ± 9.20	36.40 ± 15.80	ns
6	34.00 ± 4.3	44.00 ± 12.90	44.60 ± 17.50	1:2, 1:3 - a
12	34.60 ± 4.53	45.30 ± 9.30	51.50 ± 20.60	1:2 - b, 1:3 - a
18	35.00 ± 8.90	50.77 ± 21.80	54.70 ± 14.40	1:2 - a, 1:3 - c
Клиренс креатинина Creatinine clearance				
0	.	1.0510.39	1.11 ± 0.78	ns
6	1.18 ± 0.34	0.79 ± 0.23	0.88 ± 0.59	1:2 - b
12	1.15 ± 0.44	0.72 ± 0.26	0.84 ± 0.46	1:2 - a
18	1.13 ± 0.59	0.53 ± 0.32	0.71 ± 0.33	1:2 - a
Број жртвованих животиња Number of sacrificed rats				
6	-	5	6	11
12	5	5	6	16
18	7	9	10	26

Легенда: a = $p < 0.05$; b = $p < 0.01$; c = $p < 0.001$
Legend: a - $p < 0.05$; b - $p < 0.01$; c - $p < 0.001$

склерозу гломерула и експанзију мезангијума него хидразалин, и поред обострано добре регулације притиска крви. У моделу пацова са спонтаном артеријском хипертензијом и адриамицинском нефропатијом инхибитори конвертирајућег ензима ангиотензина смањују протеинурију [6, 10, 20, 25], нормализују системски притисак крви (Графикон 1-а), смањују гломерулску артеријску хипертензију и склерозу гломерула [7, 10, 25, 28, 29], што је уврђено и у нашој експерименталној студији (Графикон 1, Табела 2). Ово је потврђено и клиничким студијама и то првобитно код болесника с дијабетесном нефропатијом [30], а касније и код болесника с другим недијабетесним болестима бубрега [6, 31-34]. Инхибитори конвертирајућег ензима ангиотензина смањују јачину (обим) филтрације гломерула, знатно мењају проток крви у бубрегу и смањују екскрецију албумина [11]. Смањена протеинурија се објашњава и променама пропустљивости зида капилара гломерула, мењањем наелектрисаности [11] и димензија пора [35].

Код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом пораст крвног притиска настаје од 4-те до 10. недеље, а после 12. недеље притисак крви се стабилизује на константно високом нивоу [36]. Пацови испитивани у нашој студији били су стари 24 недеље на почетку студије, са стабилном артеријском хипертензијом (Графикон 1-а). Код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом прогресија оштећења бубрега се успорава са старашћу, с малим променама у гломерулима, већим у тубулоинтерстицијуму [19] и

највећим променама у крвним судовима. Пацови са спонтаном артеријском хипертензијом развијају промене у гломерулима доста касно упркос артеријске хипертензије, јер су гломерули заштићени прегломерулском вазоконстрикцијом [37]. Тубули показују атрофију и дилатацију, с цилиндрима протеина у лумену [19], уз појаву благе до умерене (30 недеља) инфилтрације лимфоцита у интерстицијуму оштећених нефрона [4]. Осим тога, уочава се хиперплазија ћелија глатких мишића артериола, са задебљањем зидом артериола и суженим луменом [4, 38] (Слика 1). Хипертрофије нема у крвним судовима мањег калибра (мање од 100 *mm*) [39]. У каснијем стадијуму, осим хипертрофије мишића артерија и артериола, виде се и фибриноидне промене у медији малих артерија и артериола [40]. У тубулоинтерстицијуму су, осим атрофије и дилатације тубула с ацелулним цилиндрима, откривају и инфламација и фиброза интерстицијума [21]. Ове, ране промене код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом, описане од других аутора, приказане су и у овом раду (Слика 1, Табела 2).

Патохистолошке промене у бубрезима пацова изазване антрациклином први пут су описали Штернберг (*Sternberg*) и Филипс (*Philips*) 1967. године [41]. Адриамицин индукује појаву нефротског синдрома. Светлосним микроскопом уочава се хронични облик склерозе гломерула, дилатације тубула и фиброзе интерстицијума [42] (Слика 2), што је све израженије с трајањем огледа, а посебно изражено после 7 месеци. Ове промене воде хроничној инсуфицијенцији бубрега [43].

Примена инхибитора конвертирајућег ензима ангиотензина (каптоприла) код пацова с адриамицинском нефропатијом смањује склерозу гломерула [7, 12, 25, 28, 29], а експанзија мезангијума такође је ретка (само у неким гломерулима). Појдарни (*Pojdarny*) и сарадници [10] чак не налазе склерозу гломерула после употребе каптоприла. У нашим ранијим студијама утврдили смо да каптоприл успорава склерозу гломерула у раној фази адриамицинске нефропатије код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом [8, 29], што је потврђено и у овој студији: каптоприл смањује промене у гломерулима и у тубулоинтерстицијуму, у свим недељама током студије, али не утиче на васкуларне промене (Табела 2, Слика 3). Повољно дејство каптоприла на промене у тубулоинтерстицијуму је од значаја, јер у последње време многи аутори описују бољу корелацију између промена у тубулоинтерстицијуму и прогресије инсуфицијенције бубрега [17, 44-46] него између промена у гломерулима и инсуфицијенције бубрега. Сем тога, неки аутори потврђују боље дејство инхибитора конвертирајућег ензима ангиотензина уколико се примени раније у току студије, тј. док су гломерули још неоштећени [47].

ТАБЕЛА 2: Семиквантитативни скор гломерулских, васкуларних и тубулоинтерстицијалних промена код свих испитаних група пацова

TABLE 2: Semiquantitative score of glomerular, vascular and tubulointerstitial lesions in all studied groups of SHR

Недеља Week	Патохистолошке промене Pathomorphological changes	Контролна група Control group	Адриамицинска група Adriamycin group	Адриамицин - каптоприлска група Adriamycin - captopril group	Статистичка значајност Statistical significance
6	Гломерули Glomerulus	-	2.40±0.55	1.83 ±0.65	ns
	Крвни судови Blood vessels	-	1.40 ± 0.55	1.00 ±0.00	ns
	Тубули Tubulus	-	1.00 ± 0.00	0.66 ± 0.22	2:3 - b
	Интерстицијум Interstitium	-	1.80 ±0.62	1.00 ±0.33	2:3 - a
12	Гломерули Glomerulus	0	3.60 ± 0.55	3.40 ±0.46	1:2; 1:3 - c
	Крвни судови Blood vessels	2.20 ± 0.45	1.80 ±0.84	1.80 ±0.41	ns
	Тубули Tubulus	1.00 ±0.00	1.40 ±0.55	1.50 ±0.55	ns
	Интерстицијум Interstitium	0	2.25 ±0.44	1.50 ±0.50	1:2; 1:3 - c; 2:3 - a
18	Гломерули Glomerulus	0.14 ±0.38	5.00 ±0.71	3.66 ±0.75	1:2; 1:3; 2:3 - c
	Крвни судови Blood vessels	3.40 ±0.19	2.20 ±0.44	2.90 ±0.32	1:2; 1:3; 2:3 - c
	Тубули Tubulus	1.00 ±0.00	2.44 ±0.53	2.20 ±0.63	1:2; 1:3 - c
	Интерстицијум Interstitium	0.14 ± 0.38	3.22±0.73	2.40 ±0.81	1:2; 1:3 - c; 2:3 - a

Легенда: a - p < 0.05; b - p < 0.01; c - p < 0.001
Legend: a - p < 0.05; b - p < 0.01; c - p < 0.001

ЗАКЉУЧАК

Код пацова са спонтаном артеријском хипертензијом и нефропатијом, изазваном адриамицином, лечење каптоприлом омогућава нормализацију притиска крви и успорава прогресију хроничне инсуфицијенције бубрега у њеном почетном стадијуму. Ове промене функције су у вези са знатним успоравањем развоја промена у гломерулима и интерстицијуму.

ЛИТЕРАТУРА

- Mann FEJ, Hilgers FK, Veelken R, Wolf. Hypertension in progressive renal disease. In: Koch K M, Stein G (Eds). Pathogenetic and Therapeutic Aspects of Chronic Renal Failure. Marcel Dekker, New York 1997;13-9.
- Ritz E, Filser D, Keller H, Reisch C. Are newer antihypertensive agents really more effective than traditional drugs in progressive renal disease? Am J Kidney Dis 1991;5(Suppl 1):76-80.
- Anderson S, Rennke HGT, Brenner M. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. J Clin Invest 1986;77:1993-2000.
- Sušić D, Mandal AK, Radujković G, Vulović D, Kentera D. Prostaglandin synthesis inhibitors potentiate the antihypertensive effect of heparin in spontaneously hypertensive rats. J Lab Clin Med 1988;3(1):64-72.
- Dworkin LD, Grosser M, Feiner HD, Ullan M, Parker M. Renal vascular effects of antihypertensive therapy in uninephrectomized SHR. Kidney Int 1989;35:790-8.
- Bernheim J. Effects of different converting - enzyme inhibitors on the course of non-diabetic glomerulopathies. Nephrol Dial Transplant 1990;5:837-40.
- Dworkin LD, Benstein JA, Parker M, Tolbert E, Feiner HD. Calcium antagonists and converting enzyme inhibitors reduce renal injury by different mechanisms. Kidney Int 1993;43:808-14.
- Djukanović Lj, Sušić D, Jovanović D, Varagić J, Jovanović Dj, Starčević A et al. Effects of captopril and hydralazine on progression of adriamycin nephropathy in spontaneously hypertensive rats. Israel J Med Sci 1994;30:742-6.
- Opsahl JA, Abraham PA, Keane WF. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in chronic renal failure. Drugs 1990;39(Suppl 2):23-32.
- Podjarny E, Rathaus AK, Shapira J, Kariv N, Pomeranz A, Zadok S et al. Captopril, but not Diltiazem, favorably affects the course of early chronic disease in rats. Nephron 1990;55:196-202.
- Erley CM, Harrer U, Kramer BK, Risler T. Renal hemodynamics and reduction of proteinuria by a vasodilating beta blocker versus an ACE inhibitor. Kidney Int 1992;41:1297-303.
- Jovanović D, Dimitrijević J, Varagić J, Jovović Dj, Starčević A, Djukanović Lj. Effects of Captopril on morphologic changes in kidney of spontaneously hypertensive rats with Adriamycin nephropathy. Renal Failure 1998;20(3):451-8.
- Jovanović BD, Djukanović Lj, Naumović R. Slowing down chronic renal failure progression with various antihypertensive agents. Clin Nephrol 1998;50(6):390-2.
- Matsumoto K, Morishita R, Moriguchi A, Tomita N, Yo Y, Nishii T et al. Prevention of renal damage by angiotensin II blockade, accompanied by increased renal hepatocyte growth factor in experimental hypertensive rats. Hypertension 1999;34:279-84.
- Maistrello I, Matscher R. Measurement by systolic blood pressure of rats: comparison of intraarterial and cuff values. J Appl Physiol 1969;26:183-93.
- Kusumoto Y, Takebayashi S, Taguchi T, Havada T, Neito S. Long term prognosis and prognostic indices of IgA nephropathy in juvenile and in adult Japanese. Clin Nephrol 1987;28:118-24.
- Wehrmann M, Bohle A, Held H, Schumm G, Kendziorra H, Pressler H. Long-term prognosis of focal glomerulonephritis. An analysis of 250 cases with particular regard to tubulointerstitial changes. Clin Nephrol 1990;33(3):115-22.
- Okada H, Suzuki H, Konishi K, Sakaguchi T, Saruta I. Histological alterations in renal specimens as indicators of prognosis of IgA nephropathy. Clin Nephrol 1992;37(5):235-8.
- Nordlander M, Havu N. Effects of chronic felodipine treatment on renal function and morphology in SHR. Kidney Int 1992;41(Suppl 36):8100-5.
- Marinides GN, Groggel GC, Cohen AH, Cook T, Baranowski R, Westensfelder C et al. Failure of Angiotensin converting enzyme inhibition to affect the course of chronic Puromycin aminonucleoside nephropathy. Am J Pathol 1987;129(2):394-401.
- Dworkin LD, Feiner HD. Glomerular Injury in uninephrectomized spontaneously rats. A consequence of glomerular capillary hypertension. J Clin Invest 1986;77:797-809.
- Yoshida Y, Kawamura T, Ikoma M, Fogo A, Ichikawa I. Effects of anti-hypertensive drugs on glomerular morphology. Kidney Int 1989;36:626-35.
- Anderson S, Meyer TW, Rennke HG, Brenner BM. Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. J Clin Invest 1985;76:612-9.
- Mann JFE, Reisch C, Ritz E. Use of angiotensin-converting enzyme inhibitors for the preservation of kidney function. Nephron 1990;55(Suppl 1):38-42.
- Tolins JP, Raij L. Angiotensin converting enzyme inhibitors and progression of chronic renal failure. Kidney Int 1990;38(Suppl 30):8118-22.
- Dworkin LD, Feiner HD, Randazzo J. Glomerular hypertension and injury in desoxycorticosterone-salt rats on antihypertensive therapy. Kidney Int 1987;31:718-24.
- Raij L, Chiou X, Owens R, Wrigley B. Therapeutic implications of hypertension induced glomerular injury. Comparison of enalapril and a combination of hydralazine, reserpine and hydrochlorothiazide in an experimental model. Am J Med 1985;79(Suppl 3C):37-41.
- Wesatenend PJ, Smits JFM, Struyker-Boudier HAJ, Weening JJ. Acute renal vascular response to ACE inhibition in two rat strains with different susceptibility to the development of glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant 1992;7:602-7.
- Jovanović D, Djukanović Lj, Sušić D, Funduk G, Jovanović Z, Dragojlović Z i sar. Uticaj kaptoprila na razvoj adriamičinske nefropatije kod pacova sa spontanom arterijskom hipertenzijom. Srp Arh Celok Lek 1996;124(Suppl 1):47-9.
- Parving H-H, Andersen AR, Smidt UM, Hommel E, Mathiesen ER, Svendsen PA. Effect of antihypertensive treatment on kidney function in diabetic nephropathy. Br Med J 1987;294:1443-7.
- Lenz T, August P. Converting enzyme inhibitors and calcium antagonists in the long-term treatment of hypertension in chronic renal failure. Wiener Klin Wochenschr 1990;102(11):316-9.
- Smith RD, Rodel PV, Mulcahy WS, Price BA. Long-term renal effects of Enalapril therapy in patients with renal insufficiency. Nephron 1990;55(Suppl 1):49-58.
- Liou HH, Huang TP, Campese VM. Effect of Long-term therapy with cCaptopril on proteinuria and renal function in patients with non-insulin-dependent diabetes and with non-diabetic renal diseases. Nephron 1995;69:41-8.
- Grazi G, Cirami C, Panichi V, Bianchi AM, Parrini M, Baronti A et al. Renal effects of Enalapril in hypertensive patients with glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant 1989;4:396-8.
- Dirks HJ, Brenner MB. Mechanisms of injury in progressive renal diseases: Insights from experimental data. Summary and concluding remarks. Kidney Int 1994;45(Suppl 45):22-3.
- Arendshorts WJ, Chatziantoniou C, Daniels FH. Role of angiotensin in the renal vasoconstriction observed during the development of genetic hypertension. Kidney Int 1990;38(Suppl 30):892-6.
- Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. Kidney Int 1984;26:137-43.
- Kakinuma Y, Kawamura T, Bills T, Yoshioka T, Ichikawa T, Fogo A. Blood pressure-independent effect of angiotensin inhibition on vascular lesions of chronic renal failure. Kidney Int 1992;42:46-55.
- Ofstad J, Horvei G, Kvam FI, Morkrid L, Sekse I, Svarstad E et al. Glomerular hemodynamics in progressive renal disease. Kidney Int 1992;41(Suppl 36):8-14.
- Sharifi AM, Li JS, Endemann D, Schiffrin EL. Effects of enalapril and amlodipine on small-artery structure and composition, and on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens 1998;16:457-66.
- Stemberg SS, Philips FS. Diphasic intoxication and nephrotic syndrome in rats given daunomycin. Proc Am Assoc Cancer Res 1967;8:64-9.
- Jovanović D. Evolutivna faza hrinične insuficijencije bubrega i mogućnosti njenog usporavanja. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet Univerziteta, Beograd 1997.
- Chagnac A, Korzets A, Ben-Bassat M, Zevin D, Hirsh J, Meckler J et al. Uninephrectomy aggravates tubulointerstitial injury in rats with Adriamycin nephrosis. Nephron 1994;66:176-80.
- Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. Lancet 1968;1:363-6.
- Bohle A, Mackersen-Haen S, Gise H, Grund KE, Wehrmann M, Batz CH et al. The consequences of tubulointerstitial changes for renal function in glomerular patients. Pathol Res Pract 1990;186:135-44.
- Cameron JS. Aspects immunologiques des nephrites tubulointerstitielles primaires et secondaires. Actual Nephrol Hosp Necker 1988;17:223-61.
- Ikoma M, Kawamura T, Kakinuma Y, Fogo A, Ishikawa I. Cause of variable therapeutic efficiency of angiotensin converting enzyme inhibitor on glomerular lesions. Kidney Int 1991;40:195-202.

SLOWING DOWN OF CHRONIC RENAL FAILURE PROGRESSION WITH CAPTOPRIL IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS WITH ADRIAMYCIN NEPHROPATHY

D. B. JOVANOVIŠH¹, DJ. JOVOVIŠH², J. VARAGIŠH³, J. DIMILRIJEVIŠH¹, LJ. DJUKANOVIŠH¹, Z. DRAGOJLOV IŠH²

1. Department of Nephrology, Medical Centre of Serbia, Belgrade; 2. Medical Biochemistry, Medical Centre of Serbia, Belgrade; 3. Institute of Medical Research, Belgrade

INTRODUCTION

The role of hypertension in chronic renal failure (CRF) progression was described in 1914 by Volhard and Fahr [1], in 1940 by Rite and colleagues [2] and subsequently many studies described the effects of various antihypertensive drugs on regulation of blood pressure and CRF progression. The recent experimental and clinical studies especially emphasized the role of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors in the regulation of hypertension and slowing down of CRF progression, but there are still issues for discussion and disagreement [2-14].

The aim of this study was to analyse the effects of captopril on clinical, biochemical and morphological changes in spontaneously hypertensive rats (SHR) with adriamycin (ADR) nephropathy.

SUBJECTS AND METHODS

Experimental animals. Adult (24 weeks) female spontaneously hypertensive rats (SHR), weighting about 200 g, were bred at the Institute of Medical Research, Belgrade. The rats were randomly divided in the following groups: 1. Control group: 12 SHR; 2. Adriamycin group (ADR): 27 SHR treated with adriamycin (2 mg/kg i.v. twice for 20 days); 3. Adriamycin-captopril group (ADR-C): 30 SHR treated with adriamycin and thereafter with captopril (60 mg/kg/day). Animals were followed-up for 18 weeks after second adriamycin injection. Systolic blood pressure was measured at 2 weeks intervals throughout the study. Blood and urine samples were collected in weeks -4, 6, 12, and 18.

Morphologic studies. Rats were killed at weeks 6, 12 or 18 after the second adriamycin injection, when the kidneys were removed and fixed in neutral buffered formalin (10%). Paraffin embedded tissue sections 4 µm thick were stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff reagent (PAS), Thrichrom Masson and Silver methanamin (Jones) for light microscopic study. A semiquantitative score was used to evaluate glomerular, vascular and tubulointerstitial changes. A minimum of 60 glomeruli for each kidney were examined, and the severity of the lesions was graduated according to the percentage of glomerular sclerosis from 0 to 10 (0 - 0%; 2 - 20%; 5 - 20-50%; 10 - 100%) [16]. Vascular changes were graduated from 0 to 3 according to hyalinosis in the walls of the arterioles (1 - 0%; 2 - < 50%; 3 - 50-100%; 4 - 100%) [17]. Tubulointerstitial changes were semiquantitatively expressed by calculation of separately the index of interstitial fibrosis (0 - 0%; 2 - < 20%; 5 - > 20%; IQ - > 40%) and the index of interstitial infiltration and tubular atrophy (0 - 0%; 1 - < 20%; 2 - > 20%; 3 - > 40%) [18]. Results were presented as mean ± SD. Differences between groups in functional data as well as morphologic lesions were studied by one-way analysis of variance and the unpaired T-test.

RESULTS

Captopril decreased systemic blood pressure in ADR SHR significantly, but failed to prevent proteinuria (Fig. 1). Urea and creatinine in serum progressively increased in all stud-

ied groups, but faster in ADR SHR groups than in controls (Table 1). Creatinine clearance decreased faster in ADR group than in ADR-C group, but without statistical significance (Table 1).

Among sixty nine analysed rats at the beginning of the study, sixteen died during the study. The other animals (Table 1) were killed at weeks 6, 12 and 18; pathohistological changes of their kidneys with glomerular, vascular and tubulointerstitial indexes are presented in Table 2.

In control group of rats minimal glomerular and interstitial changes could be seen in week 18, mild tubular changes were present in weeks 12 and 18, and marked changes in blood vessels were manifested in week 12, as well as in week 18 (Fig. 2, Table 2), when their statistical significance was higher than in rats treated with adriamycin.

Glomerular, tubular and interstitial changes were mostly pronounced in adriamycin treated rats and became more expressive during the experiment (Table 2, Fig. 3). In ADR-C group of rats captopril slowed down glomerular changes, but significantly in week 18 only (Table 2). The same was with interstitial changes (Table 2, Figs. 3-c, 4-c). Tubular and vascular changes were less in week 6 in ADR-C group than in ADR group, what was leveled off later in the study (weeks 12 and 18) (Table 2).

DISCUSSION

Although Richard Bright was probably the first person to notice that severe renal diseases were associated with changes of the cardiovascular system, Volhard and Fahr first described that high blood pressure was the major cause of progressive loss of renal function in chronic renal diseases [1]. Subsequently, many authors in their experimental and clinical studies described the effects of various antihypertensive drugs on regulation of blood pressure and slowing down of CRF progression. Various experimental models were used in their studies [8, 19-21].

With discovery of ACE inhibitors and first studies which pointed that this group of drugs effectively slowed down CRF progression, many authors studied their effects on systemic blood pressure regulation, reduction of glomerular hypertension and slowing down of CRF progression. Anderson, Rennke and Brenner studied the effects of "triple therapy" (reserpine, hydralazine and hydrochlorothiazide) and ACE inhibitor enalapril in rats with subtotal nephrectomy [3]. Enalapril decreased systemic blood pressure, glomerular hypertension, proteinuria and glomerular sclerosis [9, 22-24], while "triple therapy" reduced only systemic hypertension with no effect on glomerular hypertension and glomerular damage [25]. The same was described in uninephrectomised DOCA rats [26]. Raji and colleagues also described better effects of enalapril in relation to "triple therapy": enalapril reduced mesangial expansion and proteinuria [27]. Our study [8] as well as that of other authors [3, 25, 26] agree that ACE inhibitor captopril was better in comparison with hydralazine in slowing down glomerular sclerosis and

mesangial expansion inspite of good regulation of blood pressure with both drugs. In ADR SHR, ACE inhibitors reduced proteinuria [6, 10, 20, 25], regulated systemic blood pressure (Fig. 1-a), decreased glomerular hypertension and glomerular sclerosis [7, 10, 25, 28, 29] which were also found in our experimental study (Fig. 1, Table 2). These were confirmed in clinical studies too: first, in patients with diabetic nephropathy [30] and later in patients with nondiabetic kidney diseases [6, 30-34].

In SHRs blood pressure increased from week 4 to 10, and after week 12 blood pressure was stabilized on a constantly higher level [36]. Our studied rats were 24 weeks old at the beginning of the study and they had stable hypertension in that period (Fig. 1-a). With the age in SHRs renal function aggravated very slowly, with little changes in glomeruli, higher in tubulointerstitium [19] and the highest in blood vessels. SHRs developed glomerular changes very late inspite of hypertension, because glomeruli were protected with preglomerular vasoconstriction [37]. These mild changes described by various authors could be also seen in our study (Fig. 2, Table 2).

Pathohistological changes in rat kidneys caused with anthracycline were first described by Stenberg and Phillips in 1967 [41]. Adriamycin (doxorubicin hydrochloride) induced syndrome nephroticum. Light microscopic study revealed no changes at the beginning of the study, but later (7-9 months) glomerular sclerosis, tubular dilatation and interstitial fibrosis developed which led to chronic renal failure [42, 43], (Fig. 3).

Therapy with ACE inhibitor, captopril, in rats with adriamycin nephropathy lowered glomerular sclerosis [7, 12, 25, 28, 29], and mesangial expansion was very rare. In our earlier studies, captopril was found to decrease glomerular sclerosis in

the early phase of adriamycin nephropathy in SHRs [8, 29], what was also confirmed in this study: captopril decreased glomerular and tubulointerstitial changes in weeks 6, 12 and 18 after second adriamycin injection, but had no effect on vascular changes (Fig. 4, Table 2).

Favorable effects of captopril on tubulointerstitial changes (especially interstitial) are very important because many authors have described recently better correlation between tubulointerstitial changes and CRF progression [17, 44-46], in comparison to glomerular changes and CRF. Besides, some authors have confirmed better effects of ACE inhibitors when they were given earlier before glomeruli were damaged [47].

CONCLUSION

In SHRs with ADR nephropathy treatment with captopril normalized systemic blood pressure, and slowed down CRF progression in their early stage. These functional changes correlate with significant slowing of glomerular and interstitial changes.

Key words: Renal failure, chronic, captopril, adriamycin nephropathy. (SRP ARH CELOK LEK).

DIJANA JOVANOVIĆ
Institut za urologiju i nefrologiju
Nefrološka Klinika
Klinički centar Srbije
11 000 Beograd, Pasterova 2
Tel.: 686-740; 361-6453

ЈУГОСЛОВЕНСКА ПЕДИЈАТРИЈСКА ШКОЛА ПЕТИ КУРС

2-8. јуна 2002. године, Будва

Организатори: Удружење педијатара Југославије. Европски центар за мир и развој, UNICEF Београд, UNICEF Подгорица

ПРОГРАМ

Социјално-педијатријске теме и рад Уницефа у Југославији, имунологија, нефрологија, пулмологија, исхрана, гастроентерологија, кардиологија, хематологија, генетика, ендокринологија, неурологија, адолесцентна медицина, неонатологија с перинатологијом, онкологија, клиничка фармакологија, дечја хирургија, кардиопулмонална реанимација, дечја стоматологија, оториноларингологија, ултразвук - кукови, централни нервни систем, абдомен.

Новости у офталмологији, дерматовенерологији и метаболичким поремећајима.

Информације и резервације: SKY PASS

Тел.: 011/3248-437, 3346-858, 3228-640; факс 011/3248-891;

e-mail: skypass@eunet.yu; web: www.skypass.co.yu;

11 000 Београд, Теразије 3/VII