

بررسی اثر دیکلوفناک بر اختلالات سمیت کلیوی ایجاد شده توسط جنتامایسین در موش صحرایی

مهديه احمدي (MSc)^۱، سعيد حاجي هاشمي (PhD)^{۲*}، علي رهبري (PhD)^۳، فاطمه قنبري (PhD)^۴، محبوبه احمدي (MSc)^۱

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۲- گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
۳- گروه فارماکولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، اراک، ایران

دریافت: ۹۶/۴/۱۴، اصلاح: ۹۶/۸/۲۱، پذیرش: ۹۶/۹/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: جنتامایسین آنتی بیوتیکی است که در درمان عفونت هایی باکتری های گرم منفی مورد استفاده قرار می گیرد اما عوارض جانبی آن همانند سمیت کلیوی، استفاده از آن را محدود کرده است. این مطالعه به منظور بررسی اثر دیکلوفناک بر اختلالات کلیوی ایجاد شده توسط جنتامایسین انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار (Wistar)، در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم به ۴ گروه ۸ تایی شامل، گروه کنترل بدون دریافت هیچ گونه دارو، دریافت کننده جنتامایسین (۱۰۰ mg/kg)، دیکلوفناک (۰/۵ mg/kg)، جنتامایسین (۱۰۰ mg/kg) و دیکلوفناک هم زمان (۰/۵ mg/kg)، به صورت داخل صفاقی به مدت ۸ روز، تقسیم شدند. در روز نهم میزان فشار خون سیستولی و میزان جریان خون شریان کلیه همچنین مقادیر اوره، کراتینین، سدیم، پتاسیم، منیزیم و اسمولالیت به نمونه های پلاسما و ادرار تعیین گردید. مطالعه بافتی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین انجام شد.

یافته ها: درمان هم زمان با دیکلوفناک دفع نسبی پتاسیم ($p < 0/001$)، $328 \pm 6/17$ ، دفع نسبی سدیم ($p < 0/001$)، $0/885 \pm 0/005$ ، دفع اوره ($p < 0/001$)، $56 \pm 0/08$ ، اسمولالیت ادرار ($p < 0/001$)، $439 \pm 14/3$ و کلیترانس کراتینین ($p < 0/001$)، $0/427 \pm 0/01$ ml/min/kg را به صورت معنی داری کاهش داد و همچنین باعث کاهش بیشتر جریان خون کلیه ($2/99 \pm 0/2$) شد، که قبلاً توسط جنتامایسین کاهش یافته بود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که دیکلوفناک، اختلالات کلیوی ایجاد شده توسط جنتامایسین را تشدید می کند.

واژه های کلیدی: جنتامایسین، سمیت کلیوی، دیکلوفناک سدیم، موش صحرایی.

مقدمه

جنتامایسین التهاب در بافت بینابینی کلیه، نکروز گسترده لوله ای و تشکیل قالمهای پروتئینی ناشی از ریزش سلولها به داخل لومن را سبب میشود (۷). ضخیم شدن غشای پایه گلومرولی، نکروز و واکوئل دار شدن سلولهای اپیتلیالی توبول نزدیک، توسط جنتامایسین مشاهده شده است (۸). دیکلوفناک سدیم یک داروی ضد التهابی غیر استروئیدی (Nonsteroidal anti-inflammatory drug = NSAID) است که برای کاهش تب و درد و برای انواع التهابهای حاد و مزمن مورد استفاده قرار می گیرد (۹). NSAID های غیر انتخابی همانند دیکلوفناک و ایندومتاسین، آنزیم های سازنده پروستاگلاندین ها یعنی آنزیم های COX-1 و COX-2 را مهار میکنند (۱۰). مهار تولید پروستاگلاندینها در کلیه ها، کاهش جریان خون کلیوی و فیلتراسیون گلومرولی را سبب میشود. این داروها ایجاد التهاب و نکروز سلولی را در توبول های کلیه سبب می شود (۹). با توجه به اثرات گفته شده دیکلوفناک و همچنین اثر جنتامایسین در ایجاد نارسایی

جنتامایسین آنتی بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است که عوارض جانبی آن همانند سمیت کلیوی، استفاده از آن را محدود کرده است (۱). سمیت کلیوی ناشی از جنتامایسین به علت تجمع جنتامایسین توسط مگالین و کوپولین در سلولهای اپی تلیالی لوله نزدیک میباشد (۲). جنتامایسین توسط مکانیسم های مختلفی سبب ایجاد سمیت کلیوی میشود؛ جنتامایسین پس از ورود به سیتوزول سبب باز شدن منافذ میتوکندری شده و رهایش سیتوکروم C و تولید گونه های فعال اکسیژن را افزایش میدهد (۳). جنتامایسین از طریق اندوسیتوز وارد سلول شده و در لیزوزوم ها تجمع می یابد و با افزایش نفوذپذیری غشای لیزوزومها با تولید گونه های فعال اکسیژن، سبب القای آپوپتوز در سلولهای لوله نزدیک میشود (۴). جنتامایسین در بخش گلومرولی هم با انقباض سلولهای مزانژیل گلومرولی سبب کاهش ضریب تصفیه گلومرولی (K_f) میزان تصفیه گلومرولی (Glomerular filtration rate = GFR) می گردد (۵).

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مهديه احمدي دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اراک می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر سعيد حاجي هاشمي

آدرس: اراک، سردشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۳۴۱۷۳۵۰۵ - ۰۸۶

E-mail: hajihashemi@arakmu.ac.ir

جدول ۱. فرمول محاسبه دفع مطلق سدیم ($U_{Na}V^\circ$) و پتاسیم (U_{KV}°)، دفع نسبی سدیم ($FENa$) و پتاسیم (FEK)، کلیرانس کراتینین (C_{Cr}) از معادلات زیر استفاده شد. (V° میزان جریان ادرار می باشد).

متغیر	فرمول محاسبه
$V^\circ (\mu l/min.gkw)$	$(1000 \times UFR) / (KW \times 720)$
$CCr (ml/min.gkw)$	$(V^\circ / 1000 \times U_{Cr}) / P_{Cr}$
$U_{Na}V^\circ (\mu mol/min.gkw)$	$(V^\circ \times U_{Na}) / 1000$
$U_{KV}^\circ (\mu mol/min.g kw)$	$(V^\circ \times U_K) / 1000$
$FENa$	$(U_{Na} \times P_{Cr}) / (P_{Na} \times U_{Cr}) \times 100$
FEK	$(U_K \times P_{Cr}) / (P_K \times U_{Cr}) \times 100$

مطالعات هیستوپاتولوژیک: پس از فیکس شدن کلیه چپ قالب پارافینی تهیه شد. برش های ۵ میکرونی، با دو رنگ همتاکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شد. توسط متخصص پاتولوژی آسیب و تغییرات بافتی در بخش های گلوبرولی، لوله ای و عروقی در بین گروه ها مقایسه شد. افزایش فضای کپسول بومن، ایجاد قالب های پروتئینی در داخل لومن، واکوئل دار شدن سلولهای لوله ای، پرخونی گلوبرولی و نکروز سلولهای لوله ای در بخش لوله ای مورد مطالعه قرار گرفت. میزان آسیب ایجاد شده بر اساس درصد محاسباتی درجه بندی (Grading) شد. در صورت نبودن آسیب درجه صفر، ۱-۲۵ درصد آسیب درجه ۱، ۲۵-۵۰ درصد آسیب درجه ۲، ۵۰-۷۵ درصد آسیب درجه ۳، ۷۵-۱۰۰ درصد آسیب درجه ۴ در نظر گرفته شد (۱۹ و ۱۱۰).

آنالیز آماری: تمامی داده ها با استفاده از نرم افزار آماری Graph pad prism نسخه ۶ و از آزمون وایانس یک طرفه (ANOVA) و سپس تست Tukey و همچنین از آزمون غیرپارامتری Dunnett و kursksl wallis تجزیه و تحلیل شدند و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثرات دیکلوفناک بر میزان جریان خون کلیه و فشار خون سیستولی: فشار خون سیستولی بین هیچ کدام از گروهها تغییر معنی داری را نشان نداد (نمودار ۱). میزان جریان خون کلیه در گروه جنتامایسین ($4/94 \pm 0/3$ ml/min) و درگروه دیکلوفناک ($5/17 \pm 0/07$ ml/min) نسبت به گروه کنترل ($7/86 \pm 0/3$ ml/min) کاهش معنی داری را نشان دادند ($p < 0/001$). کاهش جریان خون کلیه با تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک نسبت به گروه جنتامایسین معنی دار نبود (نمودار ۲).

اثرات دیکلوفناک بر کلیرانس کراتینین (C_{Cr})، دفع مطلق ($U_{Na}V^\circ$) و نسبی سدیم ($FENa$) و دفع مطلق (U_{KV}°) و نسبی (FEK) پتاسیم: کلیرانس کراتینین در گروه جنتامایسین ($0/732 \pm 0/01$ ml/min/kg) و در گروه دیکلوفناک ($0/727 \pm 0/007$ ml/min/kg) کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل ($1/44 \pm 0/08$ ml/min/kg) نشان دادند. تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($0/427 \pm 0/01$ ml/min/kg) سبب کاهش معنی دار کلیرانس کراتینین نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۲).

حاد کلیوی، هدف از این تحقیق بررسی اثرات دیکلوفناک به تنهایی و استفاده همزمان دیکلوفناک و جنتامایسین بر روی عملکرد کلیه ها می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق ۱۳۹۴.۲۴۸ دانشگاه علوم پزشکی اراک بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار، در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم صورت گرفت. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به صورت متناوب و دمای محیط ($23 \pm 2^\circ C$) نگه داری شدند و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند.

روش تهیه دیکلوفناک و جنتامایسین: دیکلوفناک سدیم (sigma-Aldrich) به میزان ۰/۱۲۵ میلیگرم در ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین حل شد و به صورت IP با دوز ۵ mg/kg به هر حیوان تزریق شد. جنتامایسین به میزان ۲۵ میلیگرم از پودر جنتامایسین در ۱ ml نرمال سالین حل شد و به صورت IP با دوز ۱۰۰ mg/kg به هر حیوان تزریق شد (۱۲ و ۱۱).

گروه های مورد مطالعه:

گروه کنترل: هیچ گونه دارویی دریافت نکردند.

گروه جنتامایسین: به مدت ۸ روز متوالی جنتامایسین ۱۰۰ mg/kg (البرز دارو- ایران) (۱۳) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

گروه دیکلوفناک: به مدت ۸ روز متوالی دیکلوفناک ۰/۵ mg/kg (سیگما- آمریکا) (۱۴) به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

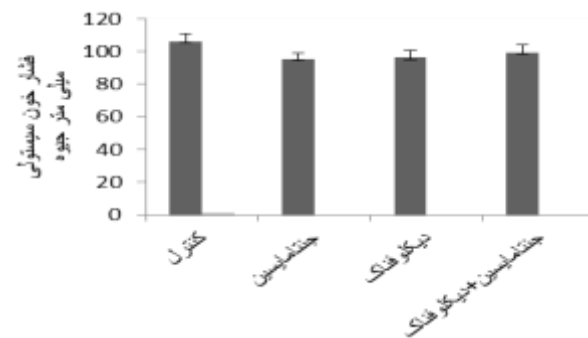
گروه دیکلوفناک+جنتامایسین: به مدت ۸ روز متوالی، به صورت هم زمان جنتامایسین ۱۰۰ mg/kg و دیکلوفناک ۰/۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

بعد از آخرین تزریق دارو، حیوانات در قفس متابولیسم قرار گرفتند، ادرار آنها در طی مدت ۱۲ ساعت جمع آوری گردید و سپس حجم ادرار به روش گراوی متری اندازه گیری گردید به این منظور حجم ادرار جمع آوری شده توزین گردید وزن ادرار برای هر میلی لیتر نشان دهنده میزان دفع مواد محلول در ادرار میباشد. میزان فشار خون سیستولی از شریان دمی با کاف دمی و با کمک دستگاه lower labP (استراليا-AD Instruments) اندازه گیری شد (۱۵ و ۱۲). شریان کلیه چپ جدا گردید و میزان جریان خون کلیه با کمک جریان نگار (flow meter) اندازه گیری شد (۱۱). برای این منظور پس از ثابت شدن جریان خون، میانگین جریان خون شریان کلیه به مدت ۳۰ دقیقه اندازه گیری شد. خون گیری از آفورت شکمی با سرنگ چهارپه سرد صورت گرفت. بعد از جدا کردن پلاسما میزان کراتینین و نیتروژن اوره خون (BUN) با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر (هلند-Auto analyzer (selectra-XL) و میزان سدیم، پتاسیم، منیزیم با استفاده از دستگاه فلیم فوتومتر (Flame photometer) (ایتالیا-EP20SEAC) اندازه گیری گردید (۱۶ و ۱۷). اسمولالیتیه نمونه های ادرار و پلاسما با استفاده از دستگاه اسمومتر (آلمان-Osmomat gonotec 030) تعیین گردید (۱۸). بعد از خارج کردن هر دو کلیه و وزن کردن آنها در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. برای محاسبه دفع مطلق سدیم ($U_{Na}V^\circ$) و پتاسیم (U_{KV}°)، دفع نسبی سدیم ($FENa$) و پتاسیم (FEK)، کلیرانس کراتینین (C_{Cr}) و میزان جریان ادرار (V°) از معادلات زیر استفاده شد (جدول ۱) (۱۷ و ۱۱).

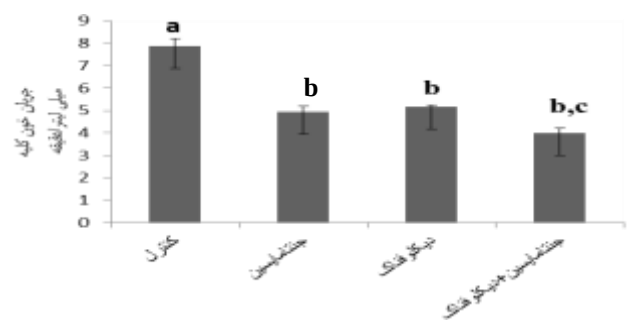
نسبت به گروه کنترل ($52/9 \pm 1/3 \mu\text{mol/mL}$) افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$) و در گروه دیکلوفناک ($33/7 \pm 1/1 \mu\text{mol/mL}$) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان دیکلوفناک و جنتامایسین ($56/9 \pm 3/1 \mu\text{mol/mL}$) باعث کاهش معنی دار دفع ادراری سدیم نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۳). دفع ادراری پتاسیم در گروه جنتامایسین ($192/4 \pm 17/5 \mu\text{mol/mL}$) افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل ($120/1 \pm 5/74 \mu\text{mol/mL}$) نشان داد ($p < 0/001$) و در گروه دیکلوفناک ($73/56 \pm 5/61 \mu\text{mol/mL}$) کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($107/5 \pm 11/06 \mu\text{mol/mL}$) سبب کاهش معنی دار دفع پتاسیم نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۳).

غلظت ادراری منیزیم در گروه جنتامایسین ($6/85 \pm 0/5 \mu\text{mol/mL}$) نسبت به گروه کنترل ($2/75 \pm 0/4 \mu\text{mol/mL}$) افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($7/1 \pm 0/1 \mu\text{mol/mL}$) باعث افزایش غلظت ادراری منیزیم نسبت به گروه جنتامایسین شد ولی این افزایش معنی دار نبود (جدول ۳). غلظت ادراری کراتینین در گروه جنتامایسین ($23/1 \pm 1/3 \text{ mg/dL}$) و در گروه دیکلوفناک ($23/1 \pm 1/3 \text{ mg/dL}$) کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل ($50/7 \pm 0/9 \text{ mg/dL}$) نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($15/1 \pm 0/7 \text{ mg/dL}$) باعث کاهش معنی دار غلظت کراتینین ادرار نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۳). غلظت ادراری اوره در گروه جنتامایسین ($82/18 \pm 8/73 \text{ mg/dL}$) و دیکلوفناک ($81/4 \pm 3/72 \text{ mg/dL}$) به گروه کنترل نشان داد ($p < 0/001$) ($115/2 \pm 5/82 \text{ mg/dL}$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($56/08 \pm 5/56 \text{ mg/dL}$) باعث کاهش معنی دار اوره ادرار نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/05$) (جدول ۳). اسمولالیت ادرار در گروه جنتامایسین ($709 \pm 24 \text{ mOsm/kgH}_2\text{O}$) و دیکلوفناک ($702 \pm 26/7 \text{ mOsm/kgH}_2\text{O}$) کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل ($1502 \pm 54/1 \text{ mOsm/kgH}_2\text{O}$) نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($439 \pm 14/3 \text{ mOsm/kgH}_2\text{O}$) سبب کاهش معنی دار اسمولالیت ادراری نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۳).

اثرات دیکلوفناک بر مقادیر پلاسمایی سدیم ($[\text{Na}]_p$)، پتاسیم ($[\text{K}]_p$)، منیزیم ($[\text{Mg}]_p$)، کراتینین ($[\text{Cr}]_p$)، اوره ($[\text{BUN}]_p$) و اسمولالیت (Osmol_p): غلظت کراتینین پلاسما در گروه جنتامایسین ($2/25 \pm 0/2 \text{ mg/dL}$) و در گروه دیکلوفناک ($1/4 \pm 0/1 \text{ mg/dL}$) نسبت به گروه کنترل ($0/52 \pm 0/05 \text{ mg/dL}$) افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($2/9 \pm 0/3 \text{ mg/dL}$) باعث افزایش معنی دار غلظت کراتینین پلاسما نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۴). غلظت اوره پلاسما در گروه جنتامایسین ($74/25 \pm 4/9 \text{ mg/dL}$) و دیکلوفناک ($57/41 \pm 1/7 \text{ mg/dL}$) نسبت به گروه کنترل ($21/3 \pm 1/06 \text{ mg/dL}$) افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($93/9 \pm 2/7 \text{ mg/dL}$) باعث افزایش معنی دار غلظت اوره پلاسما نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۴). غلظت منیزیم پلاسما در گروه جنتامایسین ($1/7 \pm 0/07 \mu\text{mol/mL}$) کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل



نمودار ۱. مقایسه تغییرات فشار خون سیستولی در گروه های مختلف



نمودار ۲. مقایسه تغییرات جریان خون شریانی کلیه

حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در کاهش میزان جریان خون می باشد ($p < 0/001$) ولی حروف مشابه اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد.

کاهش جریان خون گروه درمان همزمان جنتامایسین و دیکلوفناک در مقایسه با گروه دیکلوفناک به تنهای اختلاف معنی دار نشان داد ($p < 0/05$). درمان هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک باعث کاهش جریان خون نسبت به گروه جنتامایسین شد ولی این کاهش معنی دار نبود. دفع نسبی سدیم در گروه جنتامایسین ($2/4 \pm 0/3$) در مقایسه با گروه کنترل ($0/39 \pm 0/02$) افزایش معنی داری داشت ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($0/88 \pm 0/05$) سبب کاهش معنی دار دفع نسبی سدیم نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۲).

دفع نسبی پتاسیم در گروه جنتامایسین ($458 \pm 39/7$) افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل ($35/5 \pm 5$) نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($328 \pm 17/6$) باعث کاهش معنی دار دفع نسبی پتاسیم نسبت به گروه جنتامایسین شد ($p < 0/001$) (جدول ۲). دفع مطلق سدیم در گروه جنتامایسین ($2/2 \pm 0/6 \text{ mmol/min/kg}$) نسبت به گروه کنترل ($0/924 \pm 0/1 \text{ mmol/min/kg}$) افزایش معنی داری را نشان داد ($p < 0/001$) و در گروه دیکلوفناک ($0/723 \pm 0/1 \text{ mmol/min/kg}$) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0/05$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($1/1 \pm 0/04 \text{ mmol/min/kg}$) کاهش معنی دار دفع مطلق سدیم را نسبت به گروه جنتامایسین نشان داد ($p < 0/001$). دفع مطلق پتاسیم در بین گروهها تغییر معنی داری را نشان نداد (جدول ۲).

اثرات دیکلوفناک بر مقادیر دفع ادراری سدیم ($[\text{Na}]_u$)، پتاسیم ($[\text{K}]_u$)، منیزیم ($[\text{Mg}]_u$)، کراتینین ($[\text{Cr}]_u$)، اوره ($[\text{BUN}]_u$) و اسمولالیت (Osmol_u): دفع ادراری سدیم در گروه جنتامایسین ($76/4 \pm 2 \mu\text{mol/mL}$)

($3/8 \pm 0/2 \mu\text{mol/mL}$) نشان داد ($p < 0/001$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک ($1/5 \pm 0/1 \mu\text{mol/mL}$) سبب کاهش غلظت منیزیوم پلاسما نسبت به گروه جنتامایسین شد ولی این کاهش معنی دار نبود. غلظت سدیم، پتاسیم و اسمولالیت پلاسما در هیچ کدام از گروه‌ها تغییر معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۴).
اثرات دیکلوفناک بر تغییرات بافتی: در گروه جنتامایسین نکرور سلولهای توبولی (grade ۱)، افزایش فضای کپسول بومن (grade ۲)، واکوئل دار شدن (grade ۲) ($p < 0/001$) و نیز تشکیل قالب های پروتئینی (grade ۲) و

پرخونی گلوامرولی (grade ۲) نسبت به گروه کنترل (grade ۰) افزایش معنی داری پیدا کرد ($p < 0/001$). در گروه دیکلوفناک نیز نکرور (grade ۱)، افزایش فضای کپسول بومن (grade ۲) ($p < 0/001$) و واکوئل دار شدن (grade ۲) نسبت به گروه کنترل به صورت معنی داری افزایش یافت ($p < 0/05$). تجویز هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک در مواردی مثل واکوئل دار شدن (grade ۳) و افزایش فضای کپسول بومن (grade ۳) نسبت به گروه جنتامایسین افزایش داشت ولی این افزایش معنی دار نبود (جدول ۵، شکل ۱).

جدول ۲. مقایسه میزان کلیترانس کراتینین (Ccr)، دفع مطلق (UNaV) و نسبی سدیم (FENa) و دفع مطلق (UKV) و نسبی (FEK) پتاسیم بین چهار گروه مورد مطالعه

گروه	کنترل	جنتامایسین	دیکلوفناک	جنتامایسین+دیکلوفناک	P-value	پارامترها
دفع نسبی پتاسیم % FEK	$43/9 \pm 3/23^a$	$45/8 \pm 3/9/7^b$	$29/6 \pm 3/0/1^c$	$32/8 \pm 1/7/6^d$	$< 0/001$	
دفع نسبی سدیم % FENa	$0/39 \pm 0/002^a$	$2/4 \pm 0/3^b$	$0/231 \pm 0/004^c$	$0/885 \pm 0/005^d$	$< 0/001$	
دفع مطلق پتاسیم UKV ^o (mmol/min/kg)	$2/23 \pm 0/1^a$	$2/2 \pm 0/4^a$	$2/15 \pm 0/3^a$	$2/14 \pm 0/07^a$	$> 0/05$	
دفع مطلق سدیم UNaV ^o (mmol/min/kg)	$0/924 \pm 0/01^a$	$2/2 \pm 0/6^b$	$0/723 \pm 0/01^c$	$1/1 \pm 0/04^d$	$< 0/001$	
کلیترانس کراتینین Ccr (ml/min/kg)	$1/44 \pm 0/08^a$	$0/732 \pm 0/01^b$	$0/727 \pm 0/007^b$	$0/427 \pm 0/01^c$	$< 0/001$	

گروهها با حروف لاتین مشخص شده اند. حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در دفع نسبی پتاسیم و سدیم، دفع مطلق سدیم و کلیترانس کراتینین می باشد ولی حروف مشابه اختلاف معنی داری را نشان نمی دهد. دفع مطلق پتاسیم در بین گروه ها تغییر معنی داری را نشان نداد. نتایج با استفاده از آنالیز آماری (One way ANOVA-TUKEY) به صورت میانگین±خطای استاندارد شده از میانگین (SEM) برای ۸ موش صحرایی در هر گروه بیان شده است.

جدول ۳. مقایسه دفع ادراری سدیم ([Na_u])، پتاسیم ([K_u])، منیزیوم ([Mg_u])، کراتینین ([Cr_u])، اوره ([BUN_u]) و اسمولالیت (osmol_u) بین چهار گروه مورد مطالعه

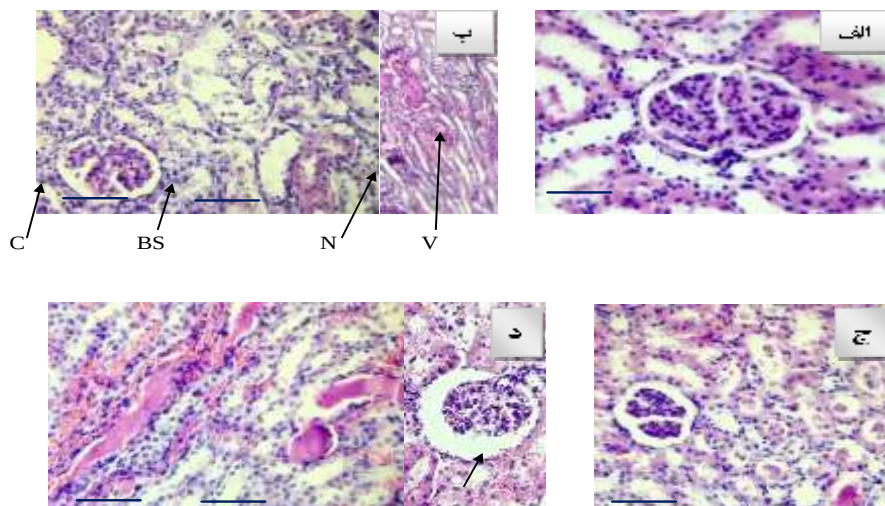
گروه ها	کنترل	جنتامایسین	دیکلوفناک	جنتامایسین+دیکلوفناک	P-value	پارامترها
($\mu\text{mol/mL}$) [Na] _u	$53/9 \pm 1/38^a$	$76/4 \pm 2^b$	$33/7 \pm 1/1^c$	$56/9 \pm 3/1^a$	$< 0/001$	
($\mu\text{mol/mL}$) [K] _u	$120/1 \pm 5/74^a$	$192/4 \pm 17/5^b$	$72/56 \pm 5/6^c$	$107/5 \pm 11/06^a$	$< 0/001$	
($\mu\text{mol/mL}$) [Mg]	$2/75 \pm 0/4^a$	$6/85 \pm 0/5^b$	$3/18 \pm 0/3^c$	$7/1 \pm 0/1^b$	$< 0/001$	
(mg/dL) [Cr] _u	$50/7 \pm 1/9^a$	$23/1 \pm 1/4^b$	$23/1 \pm 1/3^b$	$15/1 \pm 0/7^c$	$< 0/001$	
(mg/dL) [BUN] _u	$576 \pm 29/1^a$	$407 \pm 18/6^b$	$410/9 \pm 18/65^b$	$280/4 \pm 27/78^c$	$< 0/001$	
(mOsm/kgH ₂ O) Osmol _u	$150.2 \pm 54/1^a$	70.9 ± 24^b	$70.2 \pm 26/7^b$	$439 \pm 14/3^c$	$< 0/001$	

جدول ۴. مقایسه مقادیر پلاسمایی سدیم ([Na_p])، پتاسیم ([K_p])، منیزیوم ([Mg_p])، کراتینین ([Cr_p])، اوره ([BUN_p])، اسمولالیت (osmol_p) بین چهار گروه مورد مطالعه

گروه ها	کنترل	جنتامایسین	دیکلوفناک	جنتامایسین+دیکلوفناک	P-value	پارامترها
($\mu\text{mol/mL}$) [Na] _p	$144 \pm 5/8^a$	$141 \pm 5/4^a$	143 ± 8^a	145 ± 9^a	$> 0/05$	
($\mu\text{mol/mL}$) [K] _p	$4/12 \pm 0/3^a$	$4/18 \pm 0/3^a$	$3/9 \pm 0/6^a$	$4/1 \pm 0/3^a$	$> 0/05$	
($\mu\text{mol/mL}$) [Mg] _p	$3/8 \pm 0/2^a$	$1/7 \pm 0/07^b$	$2/9 \pm 0/1^c$	$1/5 \pm 0/1^b$	$< 0/001$	
(mg/dL) [Cr] _p	$0/52 \pm 0/05^a$	$2/25 \pm 0/3^b$	$1/4 \pm 0/1^c$	$2/9 \pm 0/03^d$	$< 0/001$	
(mg/dL) [BUN] _p	$21/3 \pm 1/06^a$	$74/25 \pm 4/9^b$	$57/4 \pm 1/7^c$	$93/9 \pm 2/7^d$	$< 0/001$	
(mOsm/kgH ₂ O) Osmol _p	$362 \pm 27/4^a$	$323 \pm 7/1^a$	$332 \pm 28/1^a$	$321 \pm 9/79^a$	$> 0/05$	

جدول ۵. مقایسه میزان نکروز، واکوئل دار شدن، افزایش فضای کپسول بومن، تشکیل کست و پرخونی گلومرولی بین چهار گروه مورد مطالعه

گروه ها	کنترل	جنتامایسین	دیکلوفناک	جنتامایسین+دیکلوفناک	P-value
نکروز	$\pm .^a$	$1/25 \pm 0.164^b$	$1/25 \pm 0.164^b$	$1/38 \pm 0.183^b$	<0.01
واکوئل دار شدن	$\pm .^a$	$2/75 \pm 0.164^b$	$2/63 \pm 0.183^b$	$3/75 \pm 0.164^c$	<0.01
افزایش فضای کپسول بومن	$\pm .^a$	$2 \pm .^b$	$2 \pm .^b$	$3 \pm .^c$	<0.001
تشکیل قالب های پروتئینی	$\pm .^a$	$2/25 \pm 0.164^b$	$1/25 \pm 0.164^c$	$2/38 \pm 0.183^b$	<0.001
پرخونی گلومرولی	$\pm .^a$	$2/05 \pm 0.140^b$	$1/20 \pm 0.16^c$	$2/00 \pm 0.13^b$	<0.001



C=intratubular cast, BS=Bowman's space, N=necrosis, V=vacuolization

شکل ۱. مقایسه تغییرات بافتی بین گروه های مختلف الف- گروه کنترل با ساختار گلومرولی و لوله ای طبیعی؛ ب- گروه جنتامایسین با نکروز سلولهای لوله ای، تشکیل قالب های پروتئینی، افزایش فضای کپسول بومن و واکوئل دار شدن؛ ج- گروه دیکلوفناک افزایش خفیف فضای کپسول بومن و تشکیل قالب های پروتئینی؛ د- گروه دیکلوفناک+جنتامایسین تشکیل قالب های پروتئینی شدید، افزایش شدید فضای کپسول بومن، پرخونی شدید گلومرولی (رنگ آمیزی هماتوکسیلین وائوزین با بزرگنمایی $\times 400$ و Scale bar برابر $100 \mu m$ می باشد).

بحث و نتیجه گیری

جنتامایسین می تواند با مهار اکسیداتیو $Na^+/K^+ ATPase$ و کانال های سدیمی باعث تورم سلولی، از بین رفتن تمامیت غشا و نکروز گردد (۲۴). دفع نسبی سدیم در گروه دیکلوفناک نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ولی این کاهش معنی دار نبود. درمان هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک باعث کاهش معنی دار دفع نسبی سدیم نسبت به گروه جنتامایسین شد. مطالعات گذشته نشان دادند که مهار کننده های آنزیمهای سیکلواکسیژناز مانند دیکلوفناک و ایندومتاسین اثر افزایشی روی بیان کوترانسپورتر $NKCC$ در شاخه ضخیم صعودی قوس هنله دارا می باشد که باعث بالا بردن سرعت بازجذب $NaCl$ می شود و همچنین دیکلوفناک یک اثر افزایشی روی بیان مبادله گر NHE دارا می باشد (۲۵). بنابراین اثر کاهشی دیکلوفناک در دفع نسبی سدیم ممکن است به دلیل اختلال در جذب توبولی سدیم باشد. نتایج نشان دادند که اسمولالیت پلاسما بین گروه ها تغییر معنی داری نیافت. ولی اسمولالیت ادرار در گروه جنتامایسین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافت. مطالعات نشان دادند که کاهش اسمولالیت ادرار توسط جنتامایسین به علت اثر آن بر روی کاهش بیان AQP_2 می باشد (۲۶). اسمولالیت ادرار در گروه دیکلوفناک نیز نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که می تواند به علت نارسایی کلیوی غیرالیگوریک در گروه

نتایج این مطالعه نشان داد که جنتامایسین و دیکلوفناک به صورت مجزا و به صورت توأم و همزمان، افزایش غلظت پلاسمایی کراتینین و اوره، کاهش کلیانس کراتینین، اوره و همچنین کاهش دفع ادراری آنها را سبب می شود. تغییر در این پارامترها نشان دهنده ایجاد اختلال و سمیت کلیوی بیشتر می باشد. تغییرات در عملکرد کلیه می تواند به علت کاهش در ضریب تصفیه گلومرولی (K_f) و یا نکروز سلولهای توبولی و در پی آن کاهش در تعداد نفرون های عملکردی و در نتیجه کاهش GFR ایجاد گردد (۲۰ و ۲۱).

تجویز دیکلوفناک کاهش معنی دار کلیانس کراتینین و افزایش معنی دار غلظت پلاسمایی آن را نسبت به گروه کنترل سبب گردید که این نتایج با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۲۲). درمان هم زمان با جنتامایسین و دیکلوفناک باعث افزایش معنی دار غلظت کراتینین پلاسما و کاهش معنی دار کلیانس کراتینین نسبت به گروه جنتامایسین شد. دیکلوفناک با تخریب سلولهای اپیتلیالی، افزایش نکروز و فیبروز بافتی کلیه و همچنین با آنروپی توبولی و گلومرولی بر عملکرد کلیه تاثیر می گذارد (۹). مشابه مطالعات قبلی (۲۳) جنتامایسین باعث افزایش دفع ادراری سدیم و پتاسیم در نتیجه افزایش $FENa$ و FEK گردید.

دیکلوفناک باشد (۲۲). درمان هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک باعث کاهش معنی دار اسمولالیتیه نسبت به گروه جنتامایسین شده که به علت اثر این دو ماده بر روی کلیه از طریق مکانیسم های متفاوت میباشد. در این مطالعه فشار خون در بین گروه ها ی مختلف اختلاف معنی داری را نشان نداد که علت تغییر نکردن فشارخون، دخالت مکانیسم های کوتاه مدت و میان مدت تنظیم فشار خون می باشد (۲۷).

در این مطالعه جنتامایسین باعث کاهش جریان خون شریانی کلیه شد که مطابق مطالعات قبلی می تواند با افزایش مقاومت عروق کلیه رخ دهد (۲۸). افزایش مقاومت عروق کلیه ناشی از فعال شدن فیدبک لوله ای-گومرولی (TGF) می باشد (۱). این افزایش مقاومت ناشی از افزایش تولید واسطه های تنگ کننده رگی مانند فاکتور فعال کننده پلاکتی (Platelet =PAF activating factor) و اندوتلین-۱ در عروق کلیه و بخش مزانشیال می باشد، همچنین این افزایش مقاومت می تواند تحت اثر مستقیم جنتامایسین روی سلولهای عروقی باشد (۲۹ و ۳۰). در گروه دیکلوفناک جریان خون کلیه نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که می تواند به دلیل اثر مهارکننده دیکلوفناک بر روی آنزیم های COX-1 و COX-2 باشد، مهار این آنزیم ها از تولید پروستاگلاندین ها جلوگیری می کند. از جمله مهم ترین این پروستاگلاندین ها، پروستاگلاندین E_۲ و پروستاگلاندین I_۲ می باشد که دارای نقش مهمی در اتساع عروق کلیوی و افزایش جریان خون می باشند (۱۰). همچنین مهار آنزیم های سیکلواکسیژناز

و ۲ مسیر اسید آراشیدونیک را به سمت تولید لوکوترین های انقباضی منحرف می کند که علاوه بر کاهش جریان خون کلیه می توانند سبب افزایش نفوذپذیری مویرگی و اختلالات لوله ای گردد (۳۱). مطالعات یافت شناسی نشان دادند که جنتامایسین باعث افزایش نکروز، واکوئل دار شدن، افزایش فضای بومن و افزایش تشکیل قالب های پروتئینی نسبت به گروه کنترل می شود. در گروه دیکلوفناک نیز نکروز، واکوئل دار شدن، افزایش فضای کپسول بومن، تشکیل قالب های پروتئینی و پرخونی گومرولی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که مطابق با یافته های قبلی بود (۳۲ و ۳۳). درمان هم زمان جنتامایسین و دیکلوفناک باعث افزایش بیشتر واکوئل دار شدن و افزایش بیشتر فضای بومن و پرخونی شدید گومرولی نسبت به گروه جنتامایسین شد ولی این افزایش معنی دار نبود. نتایج نشان داد که استفاده از دیکلوفناک به صورت هم زمان با جنتامایسین سبب تشدید و بدتر شدن تغییرات همودینامیکی، اختلال در دفع املاح و تغییرات بافتی ناشی از جنتامایسین می شود که می تواند به دلیل اثر دیکلوفناک در مهار تولید پروستاگلاندین ها و در نتیجه کاهش جریان خون کلیه باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک جهت حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

The Effects of Diclofenac on Renal Toxicity Disorders Induced by Gentamicin in Rats

M. Ahmadi (MSc)¹, S. Hajhashemi (PhD)^{1*}, A. Rahbari (PhD)², F. Ghanbari (PhD)³, M. Ahmadi (MSc)¹

1.Department of Physiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran.

2.Department of Pathology, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran.

3.Department of Pharmacology, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(2); Feb 2018; PP: 33-41

Received: Jul 5th 2017, Revised: Nov 12th 2017, Accepted: Dec 11th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Gentamicin, an antibiotic is used to treat infection with gram-negative bacteria. Due to side effects such as renal disorders, its use is limited. In this research the effect of diclofenac on gentamicin induced nephrotoxicity was examined.

METHODS: Male Wistar rats (n=32) weighting between 200-250 g were randomly divided into 4 groups (n = 8 in each group): 1- control group received no drug, 2- treatment group with gentamicin (100 mg/kg/day i.p) for 8 days, 3- treatment group with diclofenac (0.5 mg/kg/day i.p) for 8 days, 4- treatment group with gentamicin (100 mg/kg/day i.p) and diclofenac (0.5 mg/kg/day i.p) for 8 days. In ninth day, blood pressure and renal artery blood flow and also level of urea, creatinine, magnesium, sodium, potassium, and osmolality were measured in urine and plasma samples. Finally, histological study was performed by using Hematoxylin and Eosin staining.

FINDINGS: Co-treatment with diclofenac significantly decreased fractional excretion of potassium (328 ± 17.6 ; $P < 0.001$), fractional excretion of sodium (0.885 ± 0.005 ; $P < 0.001$), excretion of urea (56.08 ± 5.56 ; $P < 0.001$), urine osmolality (439 ± 14.3 ; $p < 0.01$) and creatinine clearance ($p < 0.001$, 0.427 ± 0.01 ml/min/kg) but decreased renal blood flow (3.99 ± 0.2), which had previously been reduced by gentamicin.

CONCLUSION: The results of the study showed that diclofenac exacerbates kidney disorders caused by gentamicin.

KEY WORDS: Gentamicine, Nephrotoxicity, Diclofenac, Rat.

Please cite this article as follows:

Ahmadi M, Hajhashemi S, Rahbari A, Ghanbari F, Ahmadi M. The Effects of Diclofenac on Renal Toxicity Disorders Induced by Gentamicin in Rats. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(2):33-41.

*Corresponding Author; S. Hajhashemi (PhD)

Address: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, I.R.Iran

Tel: +98 86 34173502

E-mail: hajhashemi@arakmu.ac.ir

References

1. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.* 2011;79(1):33-45.
2. Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, et al. Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *J Biol Chem.* 2002;277(1):618-22.
3. Morales AI, Dettaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arévalo M, et al. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney Int.* 2010;77(10):861-9.
4. Denamur S, Tyteca D, Marchand-Brynaert J, Van Bambeke F, Tulkens PM, Courtoy PJ, et al. Role of oxidative stress in lysosomal membrane permeabilization and apoptosis induced by gentamicin, an aminoglycoside antibiotic. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(9):1656-65.
5. Morales AI, Rodríguez-Barbero A, Vicente-Sánchez C, Mayoral P, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Resveratrol inhibits gentamicin-induced mesangial cell contraction. *Life Sci.* 2006;78(20):2373-7.
6. Martínez-Salgado C, Eleno N, Tavares P, Rodríguez-Barbero A, García-Criado J, Bolaños JP, et al. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int.* 2002;62(5):1682-92.
7. Derakhshanfar A, Bidadkosh A, Kazeminia S. Vitamin E protection against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: a biochemical and histopathologic study. *Iran J Vet Res.* 2007;8(3):231-8.
8. Stojiljković N, Veljković S, Mihailović D, Stojiljković M, Radovanović D, Randelović P. The effect of calcium channel blocker verapamil on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Bosni J Basic Med Sci.* 2008;8(2):170-6.
9. Aydın G, Gökçimen A, Öncü M, Çicek E, Karahan N, Gökalp O. Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by different doses of diclofenac sodium in rats. *Turk J Veterin Animal Sci.* 2003;27(5):1131-40.
10. Lomas AL, Grauer GF. The renal effects of NSAIDs in dogs. *J Am Animal Hos Associat.* 2015;51(3):197-203.
11. Hajhashemi S, Hamidzad Z, Rahbari A, Ghanbari F, Motealeghi ZA. Effects of cobalamin (vitamin B12) on gentamicin induced nephrotoxicity in rat. *Drug Res (Stuttg).* 2017;67(12):710-718.
12. Ahmadi M, Hajhashemi S, Chehrei A, Hosseini N. Therapeutic effects of *Urtica dioica* methanolic extract on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Koomesh.* 2014;15(2):220-31. [In Persian].
13. Patil CR, Jadhav RB, Singh PK, Mundada S, Patil PR. Protective effect of oleanolic acid on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Phytother Res.* 2010;24(1):33-7.
14. Tonussi CR, Ferreira SH. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol.* 1994;251(2-3):173-9.
15. Whitesall SE, Hoff JB, Vollmer AP, D'Alecy LG. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(6):2408-15.
16. Ashtiyani SC, Zohrabi M, Hassanpoor A, Hosseini N, Hajhashemi S. Oral administration of the aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* in rats before renal reperfusion injury. *Iran J Kidney Dis.* 2013 Sep;7(5):367-75.
17. Hajhashemi S, Jafarian T, Ahmadi M, Rahbari A, Ghanbari F. Ameliorative effects of *Zataria multiflora* hydro-alcoholic extract on gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Drug Res.* 2018.
18. Laustsen C, Østergaard JA, Lauritzen MH, Nørregaard R, Bowen S, Søgaard LV, et al. Assessment of early diabetic renal changes with hyperpolarized [1-13C] pyruvate. *Diabet/Metabol Res Rev.* 2013;29(2):125-9.
19. Al-Shabanah OA, Aleisa AM, Al-Yahya AA, Al-Rejaie SS, Bakheet SA, Fatani AG, et al. Increased urinary losses of carnitine and decreased intramitochondrial coenzyme A in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):69-76.
20. Savin V, Karniski L, Cuppage F, Hodges G, Chonko A. Effect of gentamicin on isolated glomeruli and proximal tubules of the rabbit. *J Technic Method Pathol.* 1985;52(1):93-102.
21. Martínez-Salgado C, Rodríguez-Barbero A, Tavares P, Eleno N, Lida e, Lopez-Novoa J, et al. Role of calcium in gentamicin-induced mesangial cell activation. *Cell Physiol Biochem.* 2000;10(1-2):65-72.
22. Besen A, Kose F, Paydas S, Gonlusen G, Inal T, Dogan A, et al. The effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium on the rat kidney, and alteration by furosemide. *Int Urolog Nephrol.* 2009;41(4):919-26.

23. Gowrisri M, Kotagiri S, Vrushabendra Swamy B, Archana Swamy P, Vishwanath K. Anti-oxidant and nephroprotective activities of *Cassia occidentalis* leaf extract against gentamicin induced nephrotoxicity in rats. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 2012;3:684-94.
24. Cuzzocrea S, Thiemermann C, Salvemini D. Potential therapeutic effect of antioxidant therapy in shock and inflammation. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1147-62.
25. Fernández-Llama P, Ecelbarger CA, Ware JA, Andrews P, Lee AJ, Turner R, et al. Cyclooxygenase inhibitors increase Na-K-2Cl cotransporter abundance in thick ascending limb of Henle's loop. *Am J Physiol-Ren Physiol*. 1999;277(2):219-26.
26. Sohn EJ, Kang DG, Lee HS. Protective effects of glycyrrhizin on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Pharmacol Toxicol*. 2003;93(3):116-22.
27. Wu X, Kentner R, Stezoski J, Kochanek PM, Jackson EK, Carlos TM, et al. Intraperitoneal, but not enteric, adenosine administration improves survival after volume-controlled hemorrhagic shock in rats. *Crit Care Med*. 2001;29(9):1767-73.
28. Morales AI, Buitrago JM, Santiago JM, Fernández-Tagarro M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antioxidant Redox Signal*. 2002;4(6):893-8.
29. Valdivielso JM, Rivas-Cabañero L, Morales AI, Arévalo M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F. Increased renal glomerular endothelin-1 release in gentamicin-induced nephrotoxicity. *Int J Experiment Pathol*. 1999;80(5):265.
30. Shahbazi F, Dashti-Khavidaki S, Khalili H, Lessan-Pezeshki M. Potential renoprotective effects of silymarin against nephrotoxic drugs: a review of literature. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2012;15(1):112-23.
31. Gulbins E, Parekh N, Rauterberg E, Schlottmann K, Steinhausen M. Cysteinyl leukotriene actions on the microcirculation of the normal and split hydronephrotic rat kidney. *Eur J Clin Investigat*. 1991;21(2):184-96.
32. Gökçimen A, Aydin G, Isen u, Karaöz E, Malas MA, Öncü M. Effect of diclofenac sodium administration during pregnancy in the postnatal period. *Fet Diagnos Thera*. 2001;16(6):417-22.
33. Gokcimen A, Akdogan G, Karaoz E. Structural and biochemical changes in liver and renal tissues induced by an acute high dose of diclofenac sodium in rats. *Biomed Res*. 2000;11(3):293-302.