

تأثیر کروسین بر آسیب‌های بافتی کلیوی و ارتشاح لکوسیتی ناشی از ایسکمی - خونرسانی مجدد در موش صحرایی

هوشنگ نجفی^۱؛ زینب محمدی یاریجانی^{۲*}؛ علی پورمتعب^۳؛ سید حمید مدنی^۴؛ سید ابوالحسن سیدزاده^۵

چکیده

زمینه: هدف این مطالعه بررسی اثرات محافظتی کروسین در برابر آسیب‌های بافتی و ارتشاح لکوسیتی ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیوی بود.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰-۳۰۰ گرم) به‌طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه Sham تحت جراحی، ولی بدون انسداد رگی قرار می‌گرفت و دوره معادل خونرسانی مجدد را سپری می‌کرد، گروه دوم، دریافت‌کننده حلال کروسین بود که تحت جراحی، نیم‌ساعت ایسکمی دوطرفه کلیوی و ۲۴ ساعت خونرسانی مجدد قرار گرفت (I/R). گروه‌های سوم تا پنجم نیز تحت ایسکمی/خونرسانی مجدد قرار گرفته و کروسین را به‌ترتیب با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ یا ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن به‌صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند. در پایان دوره خونرسانی مجدد، کلیه راست خارج شد و جهت مطالعات بافت‌شناسی تحت رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و انوزین قرار گرفت.

یافته‌ها: به‌دنبال اعمال ایسکمی/خونرسانی مجدد اندازه فضای بومن، میزان نکروز سلولی در توبول‌های کورتکس و مدولای خارجی، احتقان عروقی و قالب‌های داخل توبولی در مدولای خارجی و داخلی افزایش یافت. اما تعداد گلبول‌های قرمز در مویرگ‌های گلوبولوی کاهش یافت که تمام این آسیب‌ها توسط کروسین با هر سه دوز به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای تخفیف پیدا کردند. به‌علاوه، ایسکمی/خونرسانی مجدد منجر به ارتشاح نسبتاً شدید لنفوسیت‌ها به فضای بینابینی شد ($P < 0/001$) و مصرف کروسین توانست ارتشاح آن‌ها را به‌طور معنادار کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: تزریق داخل صفاقی کروسین دارای اثرات محافظت‌کننده در برابر آسیب‌های بافتی و ارتشاح لکوسیتی ناشی از نیم ساعت ایسکمی و ۲۴ ساعت خونرسانی مجدد در کلیه است.

کلیدواژه‌ها: ایسکمی/خونرسانی مجدد، کروسین، آسیب بافتی، ارتشاح لنفوسیتی

«دریافت: ۱۳۹۲/۵/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۱۹»

۱. مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲. گروه فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۴. گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۵. گروه نفرولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

* عهده‌دار مکاتبات: همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، تلفن: ۰۹۳۷۰۷۳۹۳۵۹

E-mail: mohamadi_zaynab@yahoo.com

مقدمه

بافت ایسکمی‌شده، خونرسانی مجدد ضروری است، اما این عمل خود آسیب مضاعفی را ایجاد می‌کند که تحت عنوان ضایعات ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد (I/R) نامیده شده است (۱ و ۲).

یکی از علل شایع نارسایی حاد کلیوی (Acute Renal Failure: ARF) ایسکمی کلیوی، در نتیجه کاهش شدید یا قطع خونرسانی به کلیه است. بدیهی است که برای بقای

توجه قرار گرفته است و گزارش شده که دارای خواص دارویی بسیاری نظیر تنظیم‌کننده چربی و ضد آترواسکلروز (۵ و ۶)، ضد تجمع پلاکتی (۷)، فعالیت ضد توموری و ضد سرطان (۸ و ۹) و ضد درد (۱۰) می‌باشد. همچنین مطالعات متعدد نشان داده‌اند که عصاره کامل زعفران (سافرون) و اجزای فعال آن در بافت‌های مختلف بدن دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی است (۴، ۱۱ و ۱۲). برخی یافته‌ها حاکی از آن است که کروسین نسبت به بقیه اجزاء دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری می‌باشد (۱۳ و ۱۴). همچنین در سال ۲۰۰۲ حسین‌زاده و یونسی در مطالعه بر روی موش سوری نشان دادند که عصاره گلبرگ و کلاله زعفران سبب کاهش ادم ناشی از زایلن در گوش می‌گردد (۱۵). در بررسی دیگری بر روی خاصیت ضد درد و التهاب زعفران گزارش شد که عصاره اتانولی زعفران، کروسین و سافرانال سبب مهار درد ناشی از تست فرمالین می‌گردند ولی در رابطه با مهار التهاب، تنها عصاره اتانولی زعفران دارای تأثیر قابل ملاحظه بود و سافرانال یا کروسین در این مورد اثری نداشتند (۱۰). همچنین Nam و همکاران در تحقیق خود نشان دادند که کروسین دارای اثرات ضد التهابی در سلول‌های میکروگلیای مغز موش صحرایی می‌باشد (۱۶). همان‌گونه که تشریح شد استرس اکسیداتیو و التهاب، دو عامل مؤثر در شروع و توسعه آسیب‌های کلیوی به‌دنبال ایسکمی/خون‌رسانی مجدد هستند که خود منجر به تشدید آسیب‌های بافتی می‌گردند. اما در هیچ‌کدام از مطالعات فوق تأثیر کروسین بر التهاب و آسیب‌های بافتی کلیوی به‌دنبال اعمال ایسکمی/خون‌رسانی مجدد مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین، در پژوهش حاضر اثرات مصرف داخل صفاقی کروسین بر روی آسیب‌های بافتی کلیوی و نیز میزان ارتشاح لکوسیت‌ها به فضای بینابینی به‌عنوان شاخص التهاب ناشی از نیم ساعت ایسکمی و ۲۴ ساعت خون‌رسانی مجدد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- حیوانات مورد بررسی

از لحاظ پاتوفیزیولوژی، اگر کاهش یا قطع خون‌رسانی کلیه برای مدت کافی باقی بماند منجر به شروع و توسعه آسیب کلیوی می‌گردد. ضایعات کلیوی حاصل از ایسکمی به سه دسته اصلی تقسیم می‌شوند، که شامل آسیب‌های لایه اندوتلیال عروق، آسیب‌های توبولی و التهاب فضای بینابینی است. آسیب‌های لایه اندوتلیال عروق با افزایش مواد منقبض‌کننده عروقی و مولکول‌های اتصالی باعث چسبیدن لکوسیت‌ها، پلاکت‌ها و گلبول‌های قرمز به اندوتلیوم و در نتیجه احتقان داخل رگی می‌گردد. آسیب‌های توبولی می‌تواند به صورت کشنده (lethal) یا تحت کشنده (sublethal) باشد. ضایعات کشنده به فرم‌های نکروز یا آپوپتوز در سلول‌های توبولی مشاهده می‌شود و ضایعات تحت کشنده شامل از بین رفتن اتصالات محکم (tight junction) بین سلول‌ها و اتصال طبیعی سلول‌های توبولی به غشاء پایه و ریزش این سلول‌ها و لبه‌های برسی (brush border) غشاء اپیکال به داخل لومن می‌باشد. سلول‌های توبولی و لبه‌های برسی کنده شده با پروتئین‌ها تشکیل قالب‌های (Cast) داخل توبولی را می‌دهند که با ممانعت در برابر جریان مایع در توبول‌ها باعث افزایش فشار داخل کپسول بومن می‌شوند. التهاب فضای بینابینی در نتیجه فعال شدن سیستم کمپلمان، تولید سیتوکین‌ها و کموکین‌ها و ارتشاح لکوسیت‌ها به داخل بافت کلیه ایجاد می‌شود که با افزایش تولید موادی نظیر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پروکسی نیتريت (ONOO⁻) باعث تشدید آسیب‌های توبولی و عروقی می‌شود (۳-۱).

زعفران (*Crocus Stivus L.*) یکی از ادویه‌های با ارزش است که در طب سنتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. از مهم‌ترین مواد مؤثر دارویی آن می‌توان به عصاره کامل (سافرون)، مواد رنگی، کروسین، کروسستین، پیکرو کروسستین، لیکوپین، موم، موسیلاژ، پلی کروئیت فرار و سافرانول اشاره نمود (۴). کروسین یکی از مهم‌ترین مواد مؤثر زعفران بوده که به دلیل اثرات دارویی گسترده‌اش، در تحقیقات مورد

قبل از القای ایسکمی به همه حیوان‌ها ۱۰۰ واحد پپارین به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شد و در تمام طول دوره جراحی با قرار دادن یک پروب مقعدی، درجه حرارت بدن حیوان اندازه‌گیری و با استفاده از یک لامپ گرمایی و صفحه حرارتی، در محدوده ۳۷ درجه سانتیگراد حفظ می‌گردید (۱۹-۱۷).

۳- بررسی آسیب‌های بافتی و ارتشاح لکوسیت‌ها

جهت بررسی هیستوپاتولوژی و تعیین میزان ارتشاح لکوسیت‌های مختلف در کلیه، نمونه‌های کلیوی حفظ شده در فرمالین ۱۰ درصد تحت مراحل آب‌گیری، پاک‌سازی و قالب‌گیری قرار گرفتند. سپس از آن‌ها برش‌های با ضخامت ۵ میکرون تهیه و با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. نواحی کورتکس، مدولای خارجی و مدولای داخلی به‌طور جداگانه با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. کورتکس از لحاظ میزان بزرگ‌شدگی فضای بومن، کاهش گلبول‌های قرمز در مویرگ‌های گلوبولوی و نکروز سلول‌ها و ریزش آن‌ها به‌داخل لومن توبول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی میزان آسیب توبولی که شامل نکروز سلول‌ها در دیواره توبول‌ها و ریزش آن‌ها به‌داخل لومن بود، میانگین تعداد سلول‌های نکروتیک در ۱۰ توبول در نظر گرفته شد. مدولای خارجی نیز از لحاظ آسیب‌های توبولی، احتقان عروقی و تشکیل قالب‌های پروتئینی در داخل توبول‌ها (Proteinaceous casts) و مدولای داخلی از نظر تشکیل قالب‌های پروتئینی در داخل توبول‌ها و احتقان عروقی مورد بررسی قرار گرفت.

درجه‌بندی آسیب‌های بافتی به این صورت انجام شد که افزایش اندازه فضای بومن در رت‌هایی که شدیدترین میزان افزایش را نسبت به گروه شاهد نشان دادند به صورت ۱۰۰ درصد آسیب در نظر گرفته شد و در بقیه موش‌های صحرائی، درصد این آسیب‌ها در مقایسه با آن محاسبه گردید. سایر تغییرات از جمله نکروز سلولی و تشکیل قالب‌های پروتئینی توبول‌های مدولاری به صورت

این مطالعه بر روی ۳۵ سر موش صحرائی نر از نژاد ویستار و در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم، تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه صورت گرفت. حیوانات تحت آزمایش در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، در محدوده حرارتی 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد نگهداری می‌شدند. در حین کار نیز کلیه مفاد و کدهای اخلاق در پژوهش‌های حیوانی مصوب وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی ایران مدنظر قرار گرفت. حیوان‌های مورد بررسی در این تحقیق به‌طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند ($n=7$). در گروه‌های I/R و I/R+C حیوان‌های تحت آزمایش، نیم ساعت قبل از جراحی به ترتیب حلال کروسین و یا کروسین را با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و یا ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در حجم کل ۰/۵ میلی‌لیتر به‌صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند (۱۱). آنگاه تحت جراحی و ایسکمی قرار گرفته و به مدت ۲۴ ساعت دوره خونرسانی مجدد را سپری می‌نمودند. در پایان دوره خونرسانی مجدد، حیوان‌ها دوباره بیهوش می‌شدند و کلیه چپ از بدن خارج و در فرمالین ۱۰ درصد فیکس می‌گردید تا تحت مطالعات بافت‌شناسی قرار گیرد. گروه شاهد نیز حلال کروسین را دریافت می‌کردند ولی در ضمن جراحی شریان و ورید کلیه‌ها مسدود نمی‌شدند و بقیه مراحل فوق را سپری می‌کردند.

۲- نحوه القای ایسکمی/خونرسانی مجدد

پس از توزین، حیوان‌ها با استفاده از اتر بیهوش می‌شدند و در ناحیه خط وسط شکمی (linea alba) یک برش طولی ایجاد می‌گردید. سپس شریان و ورید هر دو کلیه به‌طور همزمان به مدت ۳۰ دقیقه مسدود می‌شد. پس از اتمام مدت مذکور، انسداد برطرف می‌گردید و بعد از سوچور ناحیه تحت جراحی با نخ سیلک ۳ صفر، حیوان‌ها به قفس برگردانده می‌شدند تا دوره خونرسانی مجدد را به مدت ۲۴ ساعت سپری نمایند. در طی این دوره، دسترسی آزاد به آب و غذا فراهم بود. نیم ساعت

ایسکمی نیم‌ساعته کلیوی و خون‌رسانی مجدد ۲۴ ساعته در گروه I/R باعث افزایش اندازه فضای بومن با درجه ۵ نسبت به گروه شاهد گردید (شکل A, B-۱). در گروه I/R توپول پروگزیمال و بخش ضخیم صعودی قوس هنله هر دو با درجه ۳ نسبت به گروه شاهد در ناحیه کورتکس دچار نکروز سلولی شدند (شکل A, B-۲) و تعداد گلبول‌های قرمز با درجه ۴ دچار کاهش گردید. همچنین، در ناحیه مدولای خارجی گروه I/R، میزان نکروز سلولی در پارس رکتا و بخش ضخیم صعودی قوس هنله هر دو با درجه ۴ مشهود بود (شکل A, B-۳). احتقان عروقی و قالبهای پروتئینی داخل توپولی در گروه I/R با درجه ۳ در مدولای خارجی (شکل A, B-۳) و با درجه ۲ در مدولای داخلی (شکل A, B-۴) مشاهده شد. تمام این آسیب‌های بافتی در جدول ۱ خلاصه شده است.

تجویز کروسین با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌ترتیب در گروه‌های I/R+C(100) و I/R+C(200) باعث شد میزان افزایش اندازه فضای بومن در هر دو گروه به درجه ۱ برسد (شکل C, D-۱)، اما در گروه I/R+C(400) مقدار آن به درجه صفر تقلیل یافت (شکل E-۱). همچنین میزان نکروز سلولی در بخش قشری توپول پروکزیمال در گروه‌های I/R+C(100) و I/R+C(400) نسبت به گروه I/R، کاهش یک درجه‌ای و در گروه I/R+C(200) کاهش دو درجه‌ای را نشان داد، ولی تجویز کروسین با هر سه دوز باعث گردید میزان نکروز سلولی در بخش ضخیم صعودی قوس هنله ۲ درجه از مقدار آن در گروه I/R کم‌تر گردد (شکل C, D, E-۲). همچنین تعداد گلبول‌های قرمز در داخل مویرگ‌های گلومرولی که در گروه I/R با درجه ۴ کاهش یافته بودند، به‌دنبال مصرف کروسین در گروه I/R+C(100) به درجه ۲ و در گروه‌های I/R+C(200) و I/R+C(400) به درجه یک تخفیف پیدا کرد.

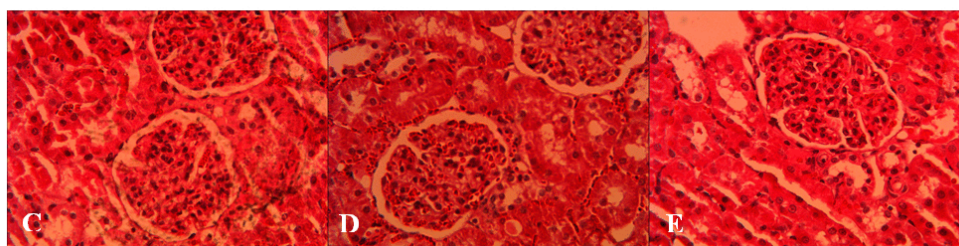
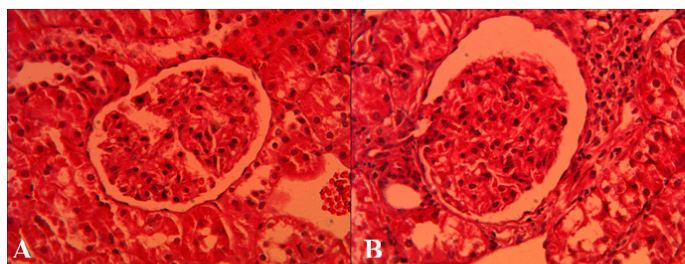
درصدی از کل ناحیه مورد مطالعه در زیر میکروسکوپ که دچار آسیب شده بود محاسبه گردید. آنگاه این درصدها بدین‌صورت درجه‌بندی شدند که به نبود آسیب درجه صفر، ۱-۲۰ درصد آسیب درجه ۱، ۲۱-۴۰ درصد آسیب درجه ۲، ۴۱-۶۰ درصد آسیب درجه ۳، ۶۱-۸۰ درصد آسیب درجه ۴ و ۸۱-۱۰۰ درصد آسیب درجه ۵ تعلق گرفت. سپس درجه کل آسیب هیستوپاتولوژیک (Total histopathologic score) محاسبه گردید که برابر با مجموع تمام درجات آسیب‌های مختلف بود. به‌علاوه، اسلایدها به‌منظور تعیین میزان ارتشاح لکوسیت‌ها در بافت کلیه نیز مورد بررسی قرار گرفتند، بدین‌صورت که تعداد آن‌ها در ۲۰ فیلد میکروسکوپ (که مساحت هر فیلد محاسبه شده بود) شمارش شد. آنگاه پس از گرفتن میانگین به‌صورت تعداد در یک میلی‌متر مربع در نظر گرفته شد (۱۷-۱۹).

۴- آنالیز آماری

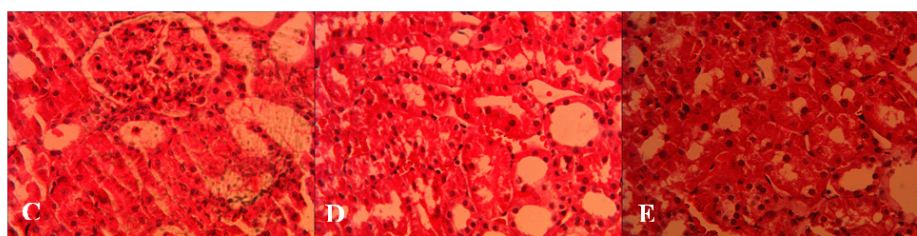
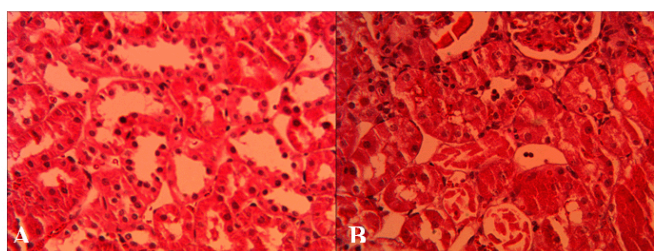
درجه کل آسیب هیستوپاتولوژیک و تعداد لکوسیت‌های خارج‌شده از عروق بافت کلیه به‌صورت میانگین \pm خطای معیار (Mean \pm SE) ارایه شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 انجام پذیرفت. جهت مقایسه میزان ارتشاح لکوسیت‌ها در بین گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه با Duncan-post hoc استفاده شد. درجه هیستوپاتولوژیک کل نیز با استفاده از آزمون Nonparametric Kruskal-Wallis multiple comparison مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و جهت مقایسه هر گروه با گروه دیگر و تعیین دقیق میزان P آن‌ها از تست آماری Nonparametric mann whitney test استفاده گردید. $P < 0/05$ به‌عنوان سطح معناداری تغییرات در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۱- تأثیر تجویز کروسین بر آسیب‌های بافتی ناشی از ایسکمی/خون‌رسانی مجدد کلیوی



شکل ۱- مقطع عرضی از کورتکس کلیه جهت نشان دادن اندازه فضای بومر در گروه‌های (A) Sham، (B) I/R، (C) I/R+C(100) و (D) I/R+C(200) و (E) I/R+C(400) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین.



شکل ۲- مقطع عرضی از کورتکس کلیه جهت نشان دادن نکروز سلول‌ها و ریزش آن‌ها به داخل لومن توبولی در گروه‌های (A) Sham، (B) I/R، (C) I/R+C(100) و (D) I/R+C(200) و (E) I/R+C(400) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین.

به‌طور شدیدی افزایش یافته بود توسط هر سه دوز کروسین تخفیف پیدا کرد (شکل ۳-C, D, E).

درجه احتقان داخل رگی و تشکیل قالب‌های داخل توبولی در مدولای داخلی در هر سه گروه دریافت‌کننده دوزهای مختلف کروسین نسبت به گروه ایسکمی/خون‌رسانی مجدد دچار کاهش گردید (شکل ۴-C-E).

در مدولای خارجی به‌دنبال مصرف کروسین، میزان نکروز سلولی در گروه‌های I/R+C(100) و I/R+C(200) به درجه ۲ و در گروه I/R+C(400) به درجه یک رسید، اما مقدار نکروز در بخش ضخیم صعودی قوس هنله توسط هر سه دوز کروسین به یک کاهش پیدا کرد. میزان احتقان عروقی و تشکیل قالب‌های پروتئینی داخل توبول‌ها نیز در مدولای خارجی که به‌علت اعمال I/R

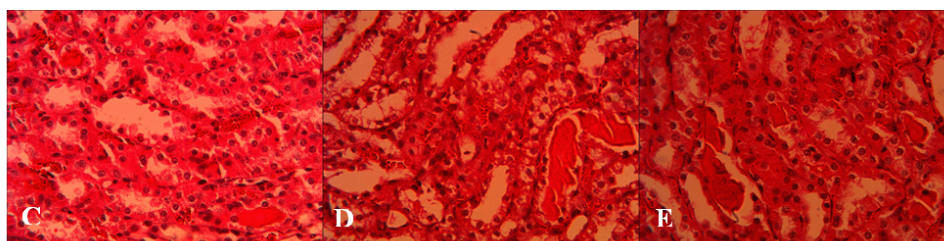
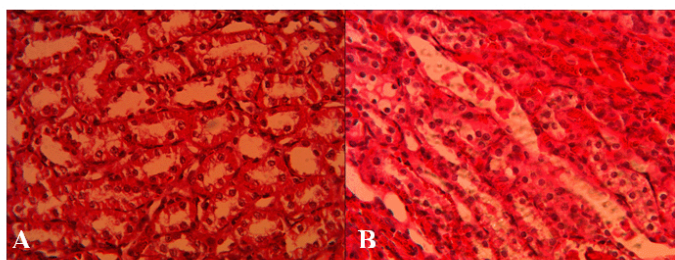
در مجموع، درجه هیستوپاتولوژیکی کل در گروه I/R برابر ۳۲ بود که تفاوت شدیدی با گروه شاهد داشت ($P < 0/01$). اما تجویز کروسین باعث شد مقدار آن در گروه I/R+C(100) به ۱۴ و در گروه‌های I/R+C(200) و I/R+C(400) به ترتیب به ۹ و ۱۲ کاهش پیدا کند، که در هر سه گروه به‌طور قابل ملاحظه‌ای کم‌تر از گروه I/R بود ($P < 0/01$). ولی همچنان با گروه شاهد نیز تفاوت معنادار داشتند ($P < 0/05$).

جدول ۱- خلاصه آسیب‌های بافتی کلیه و همچنین درجه کل آسیب بافتی در گروه شاهد (Sham) و نیز گروه‌های ایسکمی/خون‌رسانی مجدد دریافت‌کننده نرمال سالین (I/R)، کروسین با دوزهای ۱۰۰ میلی‌گرم [I/R+C(100)]، ۲۰۰ میلی‌گرم [I/R+C(200)] و یا ۴۰۰ میلی‌گرم [I/R+C(400)].

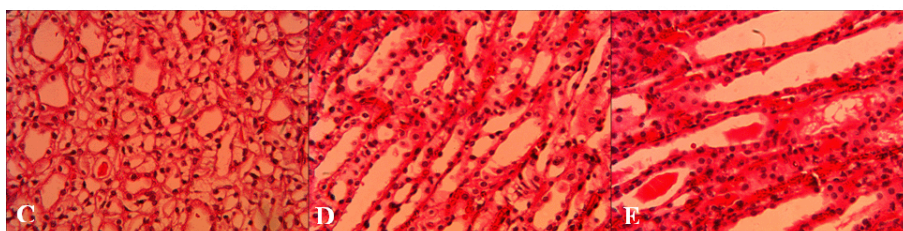
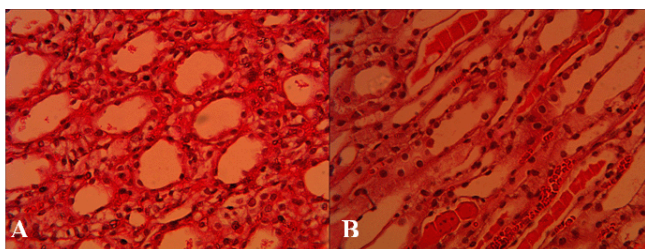
گروه‌های مورد آزمایش					آسیب هیستوپاتولوژی	
I/R+C(400)	I/R+C(200)	I/R+C(100)	I/R	Sham		
0	I	I	V	0	افزایش اندازه فضای بومن	کورتکس
0	I	II	III	0	نکروز توبول پروگزیمال	
I	I	I	III	0	نکروز بخش ضخیم هنله	
I	I	II	IV	0	کاهش تعداد گلبول قرمز در مویرگ گلوبولولی	
0	II	II	IV	0	نکروز در قسمت پارس رکتا	مدولای خارجی
I	I	I	III	0	نکروز بخش ضخیم هنله	
II	II	I	III	0	احتقان عروقی	
II	I	II	III	0	قالب‌های داخل توبولی	مدولای داخلی
I	I	I	II	0	احتقان عروقی	
I	I	I	II	0	قالب‌های داخل توبولی	
9*††	12*††	14*††	32**	0	درجه کل آسیب	

$P < 0/05$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/001$ ، اختلاف معنادار با گروه Sham.

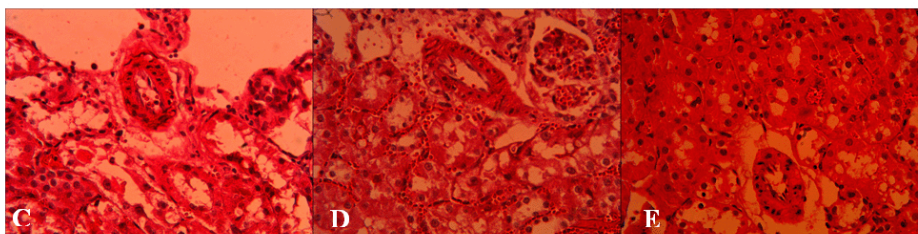
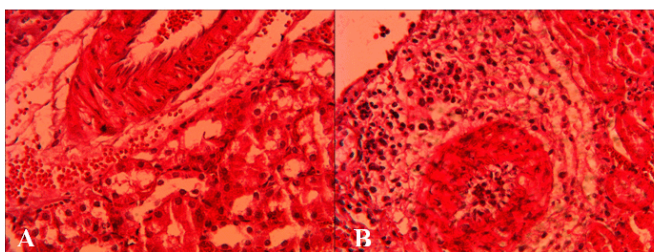
$P < 0/05$ ، $P < 0/01$ ، $P < 0/001$ ، اختلاف معنادار با گروه I/R.



شکل ۳- مقطع عرضی از مدولای خارجی کلیه جهت نشان دادن نکروز، احتقان عروقی و قالب‌های داخل توبولی در گروه‌های (A Sham، B، C، D، E) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین.



شکل ۴- مقطع عرضی از مدولای داخلی کلیه جهت نشان دادن احتقان عروقی و قالب‌های داخل توبولی در گروه‌های (A Sham, B I/R, C I/R+C(100) (D I/R+C(200) (E و I/R+C(400) با بزرگنمایی ۴۰۰ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین.



شکل ۵- مقطع عرضی از کورتکس کلیه جهت نشان دادن ارتشاح لنفوسیت‌ها به فضای بینابینی در گروه‌های (A Sham, B I/R, C I/R+C(100) (D I/R+C(200) (E و I/R+C(400) با بزرگنمایی ۴۰۰ و رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین.

مربع بود که به دنبال اعمال ایسکمی/خون‌رسانی مجدد کلیوی، میزان ارتشاح آن‌ها به فضای بینابینی کلیه به‌طور نسبتاً شدیدی زیاد شد. به نحوی که تعداد آن‌ها به حدود ۳۲ برابر در گروه I/R (شکل A, B- ۵) نسبت به گروه شاهد رسید ($P < 0/001$).

تجویز کروسین با دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در قبل از برقراری ایسکمی کلیوی منجر به کاهش چشم‌گیر ارتشاح لنفوسیت‌ها شد،

۲- تأثیر تجویز کروسین بر میزان ارتشاح لکوسیت‌ها به دنبال ایسکمی/خون‌رسانی مجدد کلیوی

نکته مهمی که باید عنوان کرد آن است که لنفوسیت‌ها تنها نوع لکوسیتی بودند که تحت تأثیر ایسکمی/خون‌رسانی مجدد به‌طور بارزی از عروق کلیوی خارج و عمدتاً در فضای بینابینی کورتکس کلیه تجمع یافته بودند. تعداد لنفوسیت‌ها در فضای بینابینی کلیه در گروه شاهد بسیار کم و در حد ۱-۴ عدد در هر میلی‌متر

سلول‌ها در مدولای داخلی و آن‌هایی که در جدار مجاری جمع‌کننده قرار گرفته‌اند حداقل آسیب را نشان می‌دهند (۱ و ۲۱). فقدان نکروز سلولی در توبول دیستال و مجاری جمع‌کننده در این تحقیق نیز همسو با این یافته‌ها می‌باشد. تخلیه ATP سلولی به‌دنبال اعمال ایسکمی منجر به مختل شدن عملکرد میتوکندری، فعال شدن روندهای التهابی و کاهش مبادله کلسیم/سدیم می‌گردد. اختلال عملکرد میتوکندری از طریق تولید ROS و در نتیجه آسیب DNA موجب نکروز می‌شود. افزایش غلظت کلسیم سیتوزول نیز علاوه بر داشتن نقش انقباضی بر روی عروق، از طریق فعال کردن پروتازها، اندونوکلتازها و فسفولیپازها، باعث شکستن اسکلت سلولی و تداخل با متابولیسم انرژی میتوکندریایی شده و در نتیجه منجر به نکروز سلول‌های اپیتلیوم توبولی می‌گردد (۲۲). پس از بازگشت جریان خون به‌دنبال اعمال ایسکمی نیز مدولای خارجی به‌علت احتقان عروقی و انسداد عروق ریز همچنان هیپوکسیک باقی می‌ماند که این هیپوکسی باعث آسیب طولانی سلول‌ها در قطعات توبولی این ناحیه خصوصاً قطعات S3 و بخش ضخیم بالارونده مدولاری، به‌خاطر نیاز بالای متابولیک آن‌ها می‌گردد. سلول‌های توبولی و لبه‌های بررسی کننده‌شده با پروتئین‌ها تشکیل قالب‌های داخل لومنی را می‌دهند که با ممانعت در برابر جریان مایع در توبول‌ها باعث افزایش فشار داخل کپسول بومن می‌شوند (۱)، که در این تحقیق به‌صورت افزایش اندازه فضای بومن، خود را نشان داد.

به‌کارگیری کروسین منجر به تخفیف افزایش اندازه فضای بومن، میزان نکروز سلولی، احتقان عروقی و قالب‌های داخل توبولی گردید. به‌نظر می‌رسد کروسین به‌واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی شناخته‌شده‌اش مانع تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه ممانعت از شکسته شدن قطعات DNA و نهایتاً کاهش میزان نکروز سلولی شده است. از طرف دیگر، با کاهش میزان نکروز سلولی و ریزش آن‌ها به‌داخل لومن توبولی، میزان تولید

به‌طوری که تجمع لنفوسیت‌ها در فضای بینابینی کلیه، کاهشی حدود ۳/۱ برابر ($P < 0/01$) در گروه I/R+C-100 و حدود ۳/۳ برابر در گروه I/R+C-200 نسبت به گروه I/R نشان داد (شکل C-D-۵). کروسین با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن نیز منجر به کاهش شدید ارتشاح لنفوسیت‌ها در گروه I/R+C-400 گردید ($P < 0/001$)، به‌نحوی که تعداد آن‌ها در این گروه به حدود میزان آن در گروه شاهد رسید و فاقد اختلاف معنادار با یکدیگر بودند (شکل E-۵).

بحث

همانگونه که مشاهده شد در گروه شاهد هیچ‌گونه آسیب بافتی وجود نداشته و نیز ارتشاح لکوسیتی رخ نداده بود. بنابراین می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که اعمال جراحی نتوانسته است منجر به این تغییرات گردد و هرگونه تغییر مشاهده‌شده بواسطه ایسکمی/خونرسانی مجدد می‌باشد. بررسی ناحیه کورتکس نشان داد که I/R کلیوی منجر به افزایش اندازه فضای بومن و نکروز توبولی آشکار در توبول پروگزیمال و بخش ضخیم بالارونده لوپ هنله در گروه I/R شده است. به‌علاوه، در مدولای خارجی این گروه نکروز توبولی در قطعه S3 و بخش ضخیم بالارونده، احتقان عروقی و قالب‌های داخل توبولی و در مدولای داخلی احتقان عروقی و قالب‌های داخل توبولی آشکار بود، به‌نحوی که درجه هیستوپاتولوژیک کل در گروه I/R شدیداً نسبت به گروه شاهد افزایش یافته بود. مطالعات مختلف در نارسایی حاد کلیوی ایسکمیک یا توکسیک نشان داده‌اند که S3 به آسیب ایسکمیک یا توکسیک حساس می‌باشد (۱ و ۲۰). سلول‌ها در این قسمت، لبه‌های بررسی خود را از دست داده و دچار نکروز شدید می‌گردند اما سلول‌های توبولی پروگزیمال در کورتکس (S1 و S2) نسبت به قطعه S3 آسیب کم‌تری نشان می‌دهند. سلول‌ها در بخش ضخیم بالارونده مدولاری هم دچار نکروز سلولی می‌گردند ولی شدت آسیب آن‌ها در مقایسه با S3 کم‌تر است. اما

از طرف دیگر Nam و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که کروسین از طریق کاهش آزاد شدن $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش فعال شدن $NF-\kappa B$ دارای اثرات ضدالتهابی در سلول‌های گلیال کشت داده شده می‌باشد (۱۶). بنابراین، به نظر می‌رسد کروسین هم به واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی خود و هم از طریق کاهش آزاد شدن فاکتورهای پیش‌التهابی بتواند میزان ارتشاح لکوسیت‌ها به فضای بینابینی کلیه را کاهش دهد.

نتیجه‌گیری

کروسین قادر است میزان آسیب‌های بافتی و نیز ارتشاح لکوسیتی ناشی از نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی و ۲۴ ساعت خونرسانی مجدد را در موش صحرایی کاهش دهد. این اثرات ممکن است از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی، کاهش آزاد شدن و همچنین کاهش فعال شدن فاکتورهای پیش‌التهابی و یا اثرات ناشناخته دیگر صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی شماره ۹۱۰۷۷ مصوب معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه و پایان‌نامه خانم زینب محمدی دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان می‌باشد که بدین وسیله از همکاری آن‌ها کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

قالب‌های داخل توپولی نیز کاهش یافته و مسیر جریان توپولی باز می‌گردد که در این مطالعه تخفیف افزایش اندازه فضای بومن در گروه‌های دریافت‌کننده کروسین نسبت به گروه I/R بیان‌گر همین موضوع می‌باشد. همسو با این فرضیه، حسین‌زاده و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی موش سوری صورت گرفت نشان دادند که تجویز کروسین سبب کاهش شدید آسیب DNA ناشی از متیل‌متان سولفونات می‌گردد (۲۳).

همچنین، در مطالعه حاضر میزان ارتشاح لنفوسیت‌ها به فضای بینابینی در گروه I/R به‌طور نسبتاً شدیدی افزایش یافته بود. در تأیید این یافته، چندین مطالعه نقش لنفوسیت‌های T- در مراحل اولیه آسیب I/R کلیوی و اهمیت نوع $CD4^+$ و نه $CD8^+$ آن‌ها را نشان داده‌اند (۲۴ و ۲۵). به‌علاوه، Liu و همکاران (۲۶) نیز در تحقیقی مشخص نمودند که افزایش نفوذپذیری عروق کلیوی به دنبال I/R هم توسط لنفوسیت‌های T- و احتمالاً از طریق تولید $TNF-\alpha$ و $IFN-\gamma$ میانجی‌گری می‌گردد. این محققان این‌گونه نتیجه‌گیری کردند که لنفوسیت‌های T- از طریق تولید سیتوکین‌ها به‌طور مستقیم در افزایش نفوذپذیری عروق کلیوی پس از I/R نقش دارند و رادیکال‌های آزاد اکسیژن همراه با سیتوکین‌ها (TNF , $IFN-\gamma$, $IL-2$, $IL-6$) نیز به‌طور مستقیم باعث فعال‌سازی بیشتر لنفوسیت‌های T- می‌شوند. از آنجایی‌که کروسین دارای خاصیت ضد رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد به‌نظر می‌رسد از این طریق بتواند میزان فعال شدن لنفوسیت‌ها را کاهش داده و در نتیجه، ارتشاح آن‌ها به فضای بینابینی را محدود نماید.

References

- Clarkson MR, Friedewald JJ, Eustace JA, Rabb H. Acute kidney injury. In: Brenner BM, Livine SA. Brenner & Rectore's the kidney. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders. 2008;943-86.
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. The New England Journal of Medicine. 1996;30:1448-59.
- Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. J Nephrol. 1999;12: S142-S151.
- Asdaq SM, Inamdar MN. Potential of Crocus Sativus (Saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. Appl Biochem Biotechnol. 2010;162(2):358-72.
- Lee IA, Lee JH, Baek NI, Kim DH. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of Gardenia jasminoids and its metabolite crocetin. Biol Pharm Bull. 2005;28(11):2106-10.

6. He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life Sci.* 2005;77(8): 907-21.
7. Liakopoulou-Kyriakides M, Skubas AI. Characterization of the platelet aggregation inducer and inhibitor isolated from *Crocus Sativus*. *Bio chem Int.* 1990;22(1):103-10.
8. Abdollaev FI. Cancer Chemopreventive and Tomoricidal properties of Saffron (*Crocus Sativus L.*). *Exp Biol Med (May Wood)*. 2002;227(1):20-5.
9. Abdullaev Jafarova F, Caballero-Ortega H, Riverón-Negrete L, Pereda-Miranda R, Rivera-Luna R, Manuel Hernández J, et al. In vitro evaluation of the chemopreventive potential of saffron. *Rev Invest Clin.* 2002;54(5):430-39.
10. Nasri S, Hosseini SY, Sahraei H, Zardooz H. Inhibition of pain and inflammation induced by formalin in male mice by ethanolic extract of saffron (*Crocus sativus*) and its constituents; crocin and safranal. *Kowsar Medical Journal.* 2010;15(4):189-95.
11. Naghizadeh B, Mansuri MT, Vadati Mashhadian N. Crocin attenuates Cisplatin - induced renal oxidative Stress in rats. *Food Chemical Toxicology.* 2010;(48):2650-55.
12. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous Saffron extracts (*Crocus Sativus L.*) and Crocin its Active Constituent on renal ischemia reperfusion induced oxidative damage in rats. *jornal Parm Parm Sci.* 2005;8(3):387-93.
13. Hosseinzadeh H, Modaghegh MH, Safari Z. *Crocus Sativus L.* Saffron extract and its active Constituents (Crocine And Safranal) on ischemia reperfusion in rat skeletal muscle. *eCAM.* 2007;6(3):343-50.
14. Assimpoulou AN, Sinakos Z, Papagergiou VP. Radical Scavenging activity of *Crocus Sativus L.* extract and its bioactive constituents. *Phytother Res.* 2005;19(11):997-1000.
15. Hossinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of *Crocus Sativus L.* Stigma and Petal extracts in mice. *BMC Pharmacology.* 2002;2(7):1-8.
16. Nam KN, Park YM, Jung HJ, Lee JY, Min BD, Park SU, et al. Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *European Journal of Pharmacology.* 2010;648:110-16.
17. Changizi Ashtiyani S, Najafi H, Kabirinia K, Vahedi E, Jamebozorky L. Oral omega-3 fatty acid for reduction of kidney dysfunction induced by reperfusion injury in rats. *Iran J Kidney Dis.* 2012;6(4):275-83.
18. Changizi Ashtiani S, Najafi H, Firozifard MR, Shafaat O. Grape seed extract for reduction of renal disturbances following reperfusion in rats. *Iran J Kidney Dis.* 2013;7(1):28-35.
19. Changizi Ashtiani S, Najafi H, Jalalvandi S, Hosseinei F. Protective effects of *rosa canina L.* fruit extracts on renal disturbances induced by reperfusion injury in rats. *Iran J Kidney Dis.* 2013;7(4):290-98.
20. Okusa MD, Linden J, Macdonald T, Huang L. Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1999;46:F404-F412.
21. Lee HT, Ota-Setlik A, Xu H, D'Agati VD, Jacobson MA, Emala CW. A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia and myoglobinuria-induced renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284:F267-F273.
22. Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284:F608-F627.
23. Hosseinzadeh H, Abootorabi A, Sadeghnia HR. Protective effect of *Crocus Sativus stigma* extract and crocin on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs. *DNA Cell Biol.* 2008;27(12):657-64.
24. Burne MJ, Daniels F, Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, et al. Identification of the CD4+ T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Inves.* 2001;108:1283-90.
25. Rabb H, Daniels F, O'Donnell M, Haq M, Saba SR, Keane W, et al. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279:F525-F531.
26. Liu M, Chien CC, Grigoryev DN, Gandolfo MT, Colvin RB, Rabb H. Effect of T cells on vascular permeability in early ischemic acute kidney injury in mice. *Microvascular Research.* 2009;77:340-47.