

Stereological Evaluation of Cell Proliferation following Intrarenal Injection of Platelet-rich Plasma in Gentamicin-treated Rats

Mafi A, Moghadam A*, Moghadam N

Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran

*Corresponding author. Tel: +989191584345, Fax: +982533209127 Email: amoghaddam@muq.ac.ir

Received: Oct 22, 2019

Accepted: Dec 21, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Nephrotoxicity is the most important side effect of gentamicin and is a concern in clinical situations. There are no therapeutic tools to prevent or palliate nephrotoxicity. Platelet-rich plasma (PRP) as a source of growth factors can be considered as a therapeutic tool. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of PRP on proliferation of epithelial cells of convoluted tubules in gentamicin-treated rat model by stereological method.

Methods: 28 male rats (200-300g) were divided into four groups, each group containing 7 animals: control, patient without treatment, sham and experimental groups. Gentamicin was injected intraperitoneally (80mg/kg/daily) for 8 days. 24 hours after the last injection, blood samples were collected to assess the serum levels of blood urea nitrogen and creatinine. The sham and experimental animals were subjected to intrarenal injection of 100 µl normal saline and PRP, respectively. 3 days later, the rats scarified under the deep anaesthesia and their kidneys were removed, prepared histologically and stained. The stereological methods were used for estimating the number of epithelial cells in convoluted tubules. Data analysis was done using SPSS 26. Differences between groups were compared with one-way analysis of variance and Duncan's multiple range test. $p < 0.05$ was considered as significant.

Results: PRP increased the number of epithelial cells in the convoluted tubules in gentamicin-treated animals ($p < 0.05$).

Conclusion: It seems that PRP can induce proliferation of epithelial cells of convoluted tubules in gentamicin-treated rat model.

Keywords: Stereology; Platelet rich Plasma; Gentamicin; Proliferation

ارزیابی استریولوژی تکثیر سلولی به دنبال تزریق پلاسمای غنی از پلاکت داخل کلیه در موش‌های صحرایی تیمارشده با جنتامایسین

افسانه مافی، عباس مقدم*، نیلوفر مقدم

مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران
* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۹۱۵۸۴۳۴۵ فاکس: ۰۲۵۳۳۲۰۹۱۲۷ پست الکترونیک: amoghaddam@muq.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: مهم‌ترین عارضه جنتامایسین، سمیت لوله‌های کلیه است که به عنوان یک چالش در بالین مطرح است. در حال حاضر درمان قطعی برای آن وجود ندارد. به نظر می‌رسد پلاسمای غنی از پلاکت به عنوان منبع سرشار از فاکتورهای رشد در پیشگیری و یا تسکین این بیماری مفید باشد. بنابراین پژوهش حاضر جهت بررسی اثر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) بر روند تکثیر سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه آسیب دیده با جنتامایسین در موش‌های صحرایی انجام شد.

روش کار: ۲۸ سر موش صحرایی نر (۳۰۰-۲۰۰ گرم) به ۴ گروه ۷ تایی شاهد، تیمار، شام و تجربی تقسیم شدند. به مدت ۸ روز جنتامایسین به میزان (۸۰ میلی گرم / کیلوگرم) روزانه به صورت داخل صفاقی تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، نمونه‌های خون جهت سنجش سطح سرمی کراتینین و ازت اوره خون جمع آوری شدند. در گروه‌های شام و تجربی به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی و پلاسمای غنی از پلاکت داخل کلیه تزریق شد. ۳ روز بعد از مداخله درمانی حیوانات تحت بیهوشی عمیق کشته شدند، کلیه‌ها خارج و مراحل پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی انجام گردید. روش استریولوژی جهت تخمین تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده استفاده شد. داده‌های حاصل در نرم‌افزار SPSS-26 و با کمک تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی دانکن در سطح معنی داری $p \leq 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: پلاسمای غنی از پلاکت، باعث افزایش معنی‌دار آماری تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه آسیب دیده با جنتامایسین در موش‌های صحرایی شد ($p \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد پلاسمای غنی از پلاکت بتواند تکثیر سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه آسیب دیده با جنتامایسین در موش‌های صحرایی را القاء کند.

واژه‌های کلیدی: استریولوژی، پلاسمای غنی از پلاکت، جنتامایسین، تکثیر

پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۳۰

دریافت: ۱۳۹۸/۷/۳۰

مقدمه

می‌باشد. علیرغم مانیتورینگ شدید و هیدراتاسیون کافی بیماران، در ۲۵-۱۰ درصد موارد درمانی، سمیت لوله‌های کلیوی ایجاد می‌گردد و گزارش شده که مسئول ۲۰-۱۰ درصد موارد نارسایی حاد کلیوی می‌باشد. همین موضوع باعث بروز مشکلات درمانی

سمیت لوله‌های کلیوی^۱ مهم‌ترین عارضه و جهت استفاده بالینی از بسیاری از داروها خصوصاً آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی نظیر جنتامایسین

^۱ Nephrotoxicity

در بیمارانی می‌گردد که این داروها تنها درمان مؤثر برای آنها است [۱].

در سمیت لوله‌های کلیوی، پدیده مرگ سلولی و از دست رفتن سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده نزدیک و دور کلیه رخ می‌دهد [۲]. ریزش باقیمانده‌های سلولی ناشی از مرگ سلولی به داخل مجرای لوله‌های خمیده، باعث انسداد کامل یا نسبی لوله‌ها شده که به نوبه خود باعث افزایش تراوش مایع تصفیه شده به داخل فضای بینابینی و مویرگ‌های دور لوله‌ای گشته، منجر به کاهش دفع فرآورده‌های متابولیتی نظیر سطح ازت اوره خون^۱ BUN و کراتینین^۲ Cr و افزایش سطح سرمی آن‌ها می‌شود [۳]. بنابراین پیشگیری از سمیت لوله‌های کلیوی و یا تسکین علائم آن در بالین یک ضرورت درمانی است که نیاز است برای آن تدابیری اندیشید.

مطالعات نشان داده که فاکتورهای رشد نقش مهمی در مهاجرت، تکثیر، تمایز و عملکرد سلول‌ها بعد از صدمات وارده دارد. از جمله این فاکتورها می‌توان به فاکتور رشد هپاتوسیتی (HGF)^۳، فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)^۴، فاکتور رشد تغییر شکل دهنده آلفا (TGF-α)^۵، فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ (IGF-1)^۶ و... اشاره کرد [۴].

مطالعات نشان داده‌اند تجویز EGF و TGF-α باعث افزایش بازسازی و ترمیم لوله‌های کلیه و بهبود عملکرد آن‌ها در مدل نارسایی حاد کلیه می‌شود [۵]. همچنین نشان داده شده است که EGF باعث افزایش بهبود عملکرد سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی بعد از آسیب‌های حاد می‌شود [۶]. مطالعه چو^۷ و همکاران نشان داد که IGF-۱ باعث افزایش بازسازی و ترمیم توبول‌های کلیه در مدل نارسایی حاد کلیه می‌شود

[۷]. محققان گزارش کردند که HGF یا ژن درمانی آن باعث کاهش فیبروز کلیوی و بهبود عملکرد کلیه می‌شود [۸].

مطالعه دیگری که توسط زایت^۸ بر روی بیماران نارسایی حاد کلیه انجام گرفت نشان داد که HGF باعث بهبود فیبروز در نارسایی حاد کلیه می‌شود [۹]. امروزه درمان موضعی با فرآورده‌های پلاکتی در بافت‌های آسیب‌دیده به دلیل توانایی این فرآورده‌ها در تسریع فرآیند بهبودی زخم و کمک به ترمیم بافت‌ها رو به افزایش است. یکی از این فرآورده‌ها، پلاسمای غنی از پلاکت است که به سادگی به وسیله سانتریفیوژ کردن خون خود فرد به دست می‌آید، آماده‌سازی آن از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است و سرشار از فاکتورهای رشد می‌باشد که هر بافتی جهت رشد و بازسازی خود به آنها نیاز دارد. فاکتورهای رشد در گرانول‌های آلفای موجود در سیتوزول پلاکت‌های موجود در PRP قرار دارد.

در مطالعه‌ای که توسط سالم^۹ و همکاران انجام گرفت مشاهده شد که PRP تاثیرات حفاظتی بر روی سمیت لوله‌های کلیوی ناشی از سیس پلاتین در موش‌های صحرایی دارد [۱۰]. همچنین در پژوهش مقدم و همکاران گزارش شد که تزریق PRP داخل قشر کلیه تحت عمل جراحی باز باعث بهبود سمیت لوله‌های کلیوی ناشی از جنتامایسین می‌گردد [۱۱].

بنابراین به PRP به عنوان یک فرآورده سرشار از فاکتورهای رشد می‌توان به عنوان یک تدبیر درمانی جدید جهت پیشگیری از سمیت لوله‌های کلیوی و یا تسکین علائم آن در راستای بهبود استفاده از جنتامایسین در بالین اندیشید.

بنابراین در این پژوهش، به بررسی تأثیر تزریق پلاسمای غنی از پلاکت داخل کلیه بر تکثیر سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه آسیب دیده با جنتامایسین در موش‌های صحرایی پرداخته شد و

¹ Blood Urea Nitrogen

² Creatinine

³ Hepatocyte Growth Factor

⁴ Epidermal Growth Factor

⁵ Transforming Growth Factor-Alpha

⁶ Insulin-like Growth Factor

⁷ Cho

⁸ Zayet

⁹ Salem

تغییرات تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده از طریق روش استریولوژی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

جامعه آماری، نمونه و نوع تحقیق

مطالعه از نوع مداخله‌ای تجربی می‌باشد. ۲۸ سرموش صحرایی بالغ نر سفید نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قم تهیه شد. حیوانات به مدت یک هفته در شرایط آزمایشگاهی استاندارد (رطوبت ۵۰ درصد، درجه حرارت 22 ± 3 درجه سانتی گراد و چرخه نور با ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند. حیوانات در طول دوره آزمایش به غذای فشرده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی (تهیه شده از خوراک دام پارس تهران) و آب آشامیدنی شهری دسترسی داشتند. فرایند کار با موش‌های صحرایی در این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی و دستورالعمل کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قم با کد اخلاق IR.MUQ.REC.1397.7 انجام شد.

موش‌های صحرایی به طور تصادفی به ۴ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه اول: به عنوان گروه شاهد و سالم، هیچگونه تیمار و مداخله درمانی در آن‌ها انجام نگرفت. گروه دوم: به عنوان گروه تیمار (دریافت‌کننده جنتامایسین)، القاء بیماری با جنتامایسین به صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۸ روز به میزان ۸۰ میلی گرم روزانه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش‌ها انجام شد [۱۲] و مداخله درمانی در آن‌ها انجام نگرفت. گروه سوم: به عنوان گروه شم، نظیر گروه دوم جنتامایسین دریافت کرد و ۴۸ ساعت بعد از آخرین دوز تحت تزریق ۱۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی داخل کلیه قرار گرفت. گروه چهارم: به عنوان گروه تجربی نظیر گروه دوم جنتامایسین دریافت کرد و ۴۸ ساعت بعد از آخرین دوز، تحت

تزریق ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای غنی از پلاکت داخل کلیه قرار گرفت.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی

به منظور تایید آسیب لوله‌های خمیده کلیه، ۲۴ ساعت بعد از آخرین دوز تزریقی جنتامایسین، تحت بیهوشی عمیق استنشاقی باهالوتان به کمک دستگاه بیهوشی (۲ سی‌سی در دقیقه به ازای هر گرم وزن بدن حیوان) [۱۳]، از قلب موش‌ها ۱ میلی‌لیتر خون گرفته شد. خونگیری از قلب با روش Cardiac Puncture انجام شد. به این ترتیب که حیوان در وضعیت گماری پشتی قرار داده شد. یک سرسوزن طویل در زیر جناغ روی خط وسط قرار گرفت و پس از ورود به پوست با زاویه ۴۵ درجه به سمت دیافراگم جهت‌گیری شد. جریان یافتن سریع خون به داخل سرنگ تاییدی بر قرارگیری صحیح آن در قلب حیوان بود [۱۳] نمونه‌های خون بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و سانتریفیوژ شدند. سطح سرمی BUN و Cr با دستگاه اتوآنالایزر^۱ و بر اساس دستورالعمل کیت آنزیمی پارس آزمون (بر حسب میلی گرم/دسی لیتر) اندازه‌گیری شد. ۳ روز پس از مداخله درمانی و قبل از برداشت بافت کلیه، برای بار دوم ۱ میلی‌لیتر خون از قلب حیوان جهت مشاهده تغییرات ازت اوره خون و کراتینین سرم انجام گردید.

تهیه پلاسمای غنی از پلاکت

جهت تهیه پلاسمای غنی از پلاکت، از خون ۵ موش سالم استفاده گردید. تحت شرایط کاملاً استریل، ۵ میلی‌لیتر خون از قلب هر حیوان تحت بیهوشی عمیق استنشاقی با هالوتان به کمک دستگاه بیهوشی (۲ سی‌سی در دقیقه به ازای هر گرم وزن بدن حیوان) [۱۳]، گرفته شد و به لوله‌های آزمایش حاوی ماده ضد انعقاد سیترات سدیم ۳/۲ درصد با نسبت حجمی ۱ به ۹ (سیترات به خون) منتقل شد. گلبول‌های قرمز و پلاسما با قرار دادن لوله‌های آزمایش در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰ بار در ثانیه

^۱ Auto Analyzer



تصویر ۱. آماده سازی موش صحرایی جهت انجام عمل تزریق پلاسمای غنی از پلاکت داخل کلیه. حیوان در وضعیت خوابیده به پهلو چپ قرار دارد. تحت بیهوشی عمیق استنشاقی با هالوتان به کمک دستگاه بیهوشی (۲ سی سی در دقیقه به ازای هر گرم وزن بدن)، محل انجام تزریق با کندن موها و ضد عفونی شدن با الکل و بتادین آماده شده است. استفاده از پد زیر پهلو چپ، دسترسی به موقعیت کلیه راست از سطح پوست را امکان پذیر می سازد

روش آماده سازی بافت کلیه جهت مطالعات استریولوژی

سه روز بعد از درمان با PRP، حیوان تحت بیهوشی عمیق کشته شد و کلیه راست جهت مطالعات استریولوژی خارج شد. پس از توزین، حجم اولیه بر اساس اصل ارشمیدس، از طریق روش غوطه وری در Orientator به دست آمد. با استفاده از روش IUR¹ تهیه برش های یکنواخت تصادفی ایزوتروپیک¹ تهیه شد و بعد از پاساژ بافتی و تهیه قالب های پارافینی با استفاده از میکروتوم برش های ۳۰ میکرومتری تهیه و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند.

از یکدیگر جدا شدند. پلاسما به لوله دیگری منتقل شد و برای بار دوم به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰ بار در ثانیه سانتریفیوژ گردید. ۲/۳ بالایی فرآورده به دست آمده که حاوی مقدار ناچیزی پلاکت بود دور ریخته شد و ۱/۳ پایینی به عنوان پلاسمای غنی از پلاکت نگه داشته شد [۱۴]. و به قسمت های کوچک تقسیم و جهت استفاده های بعدی در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد فریز گردید. شمارش پلاکتی هم بر روی خون کامل و هم بر روی PRP انجام شد.

عمل تزریق پلاسمای غنی از پلاکت داخل کلیه

جهت انجام تزریق، حیوان در وضعیت خوابیده به پهلو چپ قرار داده شد، تحت بیهوشی عمیق استنشاقی با هالوتان به کمک دستگاه بیهوشی (۲ سی سی در دقیقه به ازای هر گرم وزن بدن حیوان) [۱۳]، محل جراحی با کندن موها و ضد عفونی شدن با الکل و بتادین آماده شد. روش بیوپسی کلیه از پهلو برای دستیابی به کلیه راست انتخاب شد. استفاده از پد زیر پهلو چپ، دسترسی به موقعیت کلیه راست از سطح پوست را امکان پذیر می سازد (تصویر ۱). یک خط مایل فرضی در ناحیه کمر از زیر حاشیه دنده ای تا ناحیه ایلیاک کمرست در نظر گرفته شد. ۱۰۰ میکرولیتر PRP با استفاده از سرنگ انسولین مجهز به Spacer، از سطح پوست در ۴ نقطه جداگانه بصورت یک درمیان در طرفین خط فرضی ترسیم شده. در جایگاه آناتومیک کلیه و به فاصله ۲ میلی متر از یکدیگر داخل کلیه تزریق شد [۱۵].

محل تزریق برای جلوگیری از خونریزی احتمالی، تحت پانسمان فشاری (به مدت ۳ دقیقه) قرار گرفت. در گروه شم نیز به روش بالا، سرم فیزیولوژی داخل کلیه تزریق شد.

¹ Isotropic Uniform Random

محاسبه چروکیدگی بافت

فرآیندهای فیکس کردن بافت‌ها، پاساژ بافتی، قالب‌گیری، برش زدن و رنگ‌آمیزی بافت باعث ایجاد بدشکلی‌هایی در بافت نظیر چروکیدگی و تورم می‌گردد که باعث می‌شود حجم بافت چروکیده و یا متورم شود که به نوبه خود می‌تواند روی اندازه‌گیری‌های استریولوژی مانند حجم، طول و تعداد تأثیر بگذارد. بنابراین بدشکلی‌های بافتی که

بیشتر به صورت چروکیدگی اتفاق می‌افتد باید تخمین زده شود.

به منظور محاسبه میزان چروکیدگی با استفاده از یک تروکار با قطر ۵ میلی متر، یک قطعه گرد از یکی از برش‌ها تهیه شد. مساحت بافت دایره ای شکل تهیه شده، بعد از فرآیندهای آماده سازی بافتی تخمین زده شد [۱۱]. درجه چروکیدگی با استفاده از فرمول زیر تخمین زده شد.

$$\text{مساحت بافت دایره ای شکل قبل از } / \text{مساحت بافت دایره ای شکل بعد از فرآیند آماده سازی بافت} - ۱ = \text{درجه چروکیدگی}^{۱/۵} \text{ (فرآیند آماده سازی بافت)}$$

توان ۱/۵ برای محاسبه چروکیدگی در فضای سه بعدی از روی تصاویر دوبعدی ضروری است.

حجم نهایی کلیه بعد از پاساژ بافتی و رنگ‌آمیزی با استفاده از فرمول زیر تخمین زده شد:

$$\text{(درجه چروکیدگی - ۱)} \times \text{حجم اولیه کلیه} = \text{حجم نهایی کلیه}$$

شمارش تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده دور و نزدیک کلیه

شمارش تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده دور و نزدیک کلیه بر روی برش‌های با ضخامت ۳۰ میکرومتر، با استفاده از روش دیسکتور نوری^۱ انجام شد. با استفاده از برنامه نرم‌افزاری، یک قاب شمارش‌گر بدون سوگیری^۲ بر روی تصاویر بافت کلیه قرار گرفت. این قاب^۳ دارای دو خط شمول^۴ (واقع در بالا و سمت راست آن) و دو خط غیرشمول^۵ (واقع در پایین و سمت چپ آن) می‌باشد. هسته‌های سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده دور و نزدیک کلیه که به طور کامل یا نسبی داخل قاب قرار داشت، اما با خطوط غیرشمول برخورد نداشت، شمرده شد (تصویر ۲). هسته‌ها در ۱۴ تا ۱۰ میدان دید میکروسکوپی که با روش نمونه‌گیری تصادفی سیستماتیک انتخاب شده بودند، شمارش شدند.

ارتفاع دیسکتور در طی شمارش ۱۸ میکرومتر در نظر گرفته شد. به منظور محاسبه تراکم عددی در واحد حجم^۶، $\bar{N}_V$ از فرمول زیر استفاده شد:

$$\bar{N}_V = \frac{1}{f \cdot h} \cdot \frac{\sum Q}{\sum P}$$

که در آن $\bar{N}_V$ تخمینی از تراکم عددی در واحد حجم است. $\sum Q$ مجموع سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده دور و نزدیک کلیه، $\sum P$ مجموع قاب‌های مربوط به نقاط برخورد با فضای مرجع^۷ و h و f به ترتیب نشانگر ارتفاع دیسکتور و مساحت قاب است. در بیولوژی، نسبت‌هایی نظیر تراکم عددی فقط وقتی کاملاً قابل تفسیر می‌شوند که برای به دست آوردن تخمینی از کمیت کل، با تخمینی از حجم کامل مرجع ترکیب شوند.

^۶ Numerical Density

^۷ Reference Space

^۱ Optical Dissector

^۲ Unbiased Counting Frame

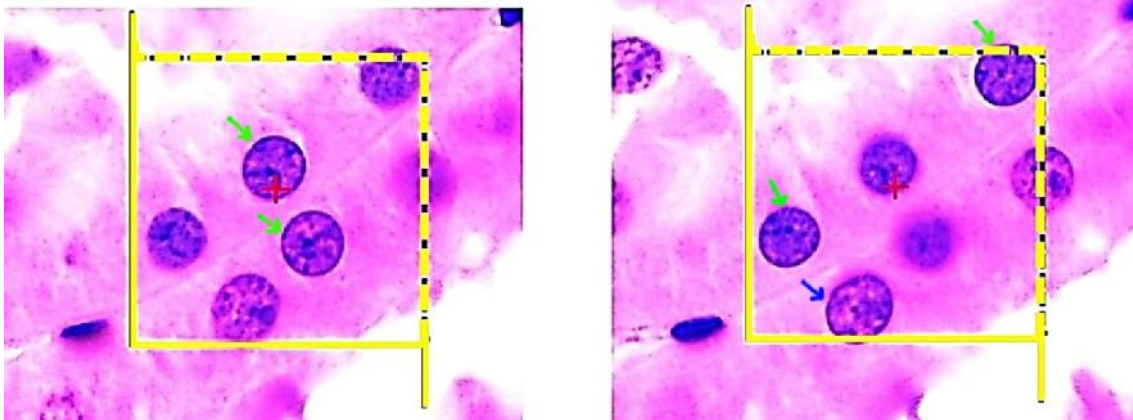
^۳ Frame

^۴ Inclusion

^۵ Exclusion

برای محاسبه تعداد کل سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده دور و نزدیک کلیه، از فرمول زیر استفاده شد [۱۶]:

$$\text{تعداد کل سلول‌ها} = \text{تراکم عددی سلول‌ها در واحد حجم} \times \text{حجم نهایی کلیه}$$



تصویر ۲. بافت کلیه موش صحرایی که با استفاده از برنامه نرم‌افزاری، یک قاب شمارش گر بدون سوگیری بر روی تصاویر قرار گرفته است. این قاب مربوط به شمارش تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده دور و نزدیک کلیه توسط روش دیسکتور نوری است. قاب دارای دو خط شمول (واقع در بالا و سمت راست آن) و دو خط غیرشمول (واقع در پایین و سمت چپ آن) می‌باشد. هسته‌های سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده دور و نزدیک کلیه که به طور کامل یا نسبی داخل قاب قرار داشته باشند، اما با خطوط غیرشمول برخورد نداشته باشند، شمرده خواهند شد. هسته سلول‌های قابل شمارش با پیکان سبز و هسته سلول‌هایی که شمارش نمی‌شوند با پیکان آبی نمایش داده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی‌های آماری توسط نرم افزار SPSS-26 انجام شد. ابتدا با استفاده از آزمون کالموگراف-اسمیرنف^۱، طبیعی بودن توزیع داده‌ها تعیین شد. سپس بر مبنای تبعیت داده‌ها از توزیع طبیعی، به منظور ارزیابی تفاوت‌های درون گروهی و بین گروهی از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه^۲ و آزمون تعقیبی دانکن استفاده شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

شمارش پلاکت‌ها

تعداد پلاکت‌ها در خون کامل موش‌های صحرایی 511×10^3 پلاکت در هر میکرولیتر بود در حالی که

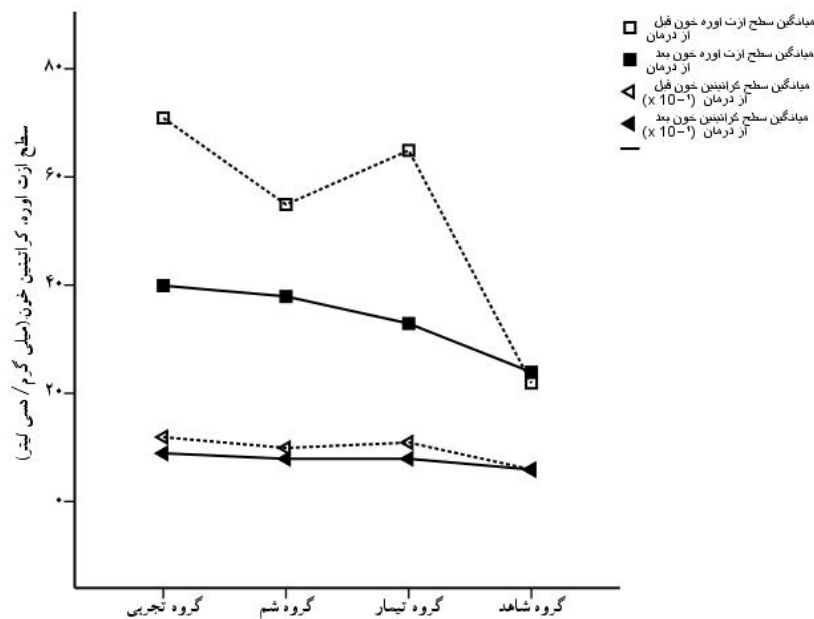
در پلاسمای غنی از پلاکت 2017×10^3 پلاکت در هر میکرولیتر یعنی افزایش چهار برابری غلظت آن بود.

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی

مقایسه میانگین سطح ازت اوره خون سرم در پایان دوره تیمار در گروه‌هایی که جنتامایسین دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد افزایش معنی دار آماری را نشان داد ($p < 0.01$). مقایسه میانگین سطح کراتینین سرم نیز در پایان دوره تیمار در گروه‌هایی که جنتامایسین دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار آماری را نشان داد ($p < 0.01$). مقایسه میانگین سطح ازت اوره خون بین گروه‌های تیمار، شم و تجربی سه روز بعد از مداخله درمانی، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. مقایسه میانگین سطح کراتینین سرم بین گروه‌های تیمار، شم و تجربی نیز سه روز بعد از مداخله درمانی، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (نمودار ۱).

¹ Kolmogorov-Smirnov Test

² One Way ANOVA



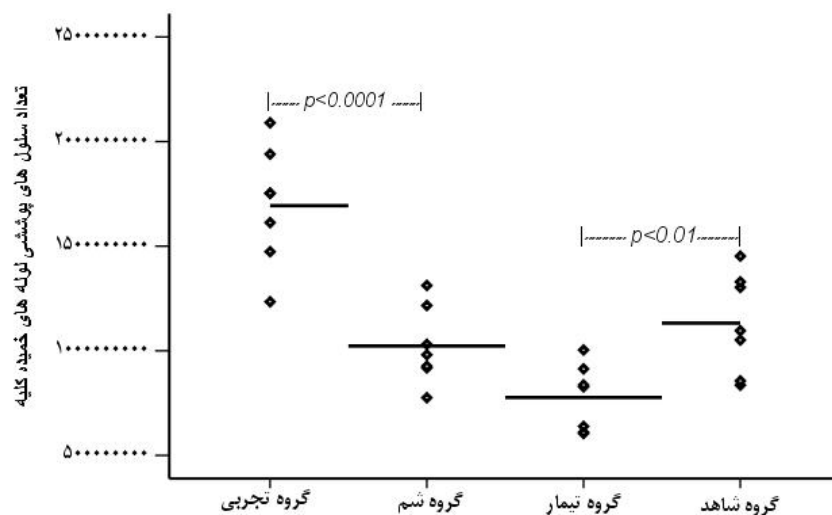
نمودار ۱. مقایسه میانگین سطح سرمی کراتینین و اورت اوره خون در گروه‌های شاهد، بیمار، شم و تجربی در موش‌های صحرایی بیمار شده با جنتامایسین قبل و بعد از درمان با پلاسما غنی از پلاکت

مقایسه میانگین تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های

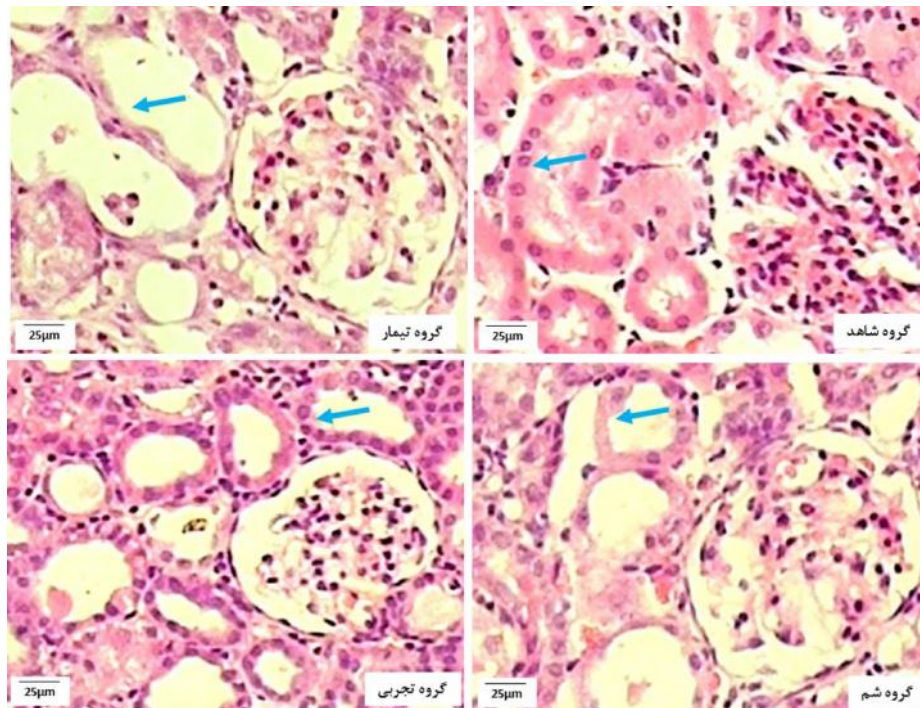
خمیده کلیه بین گروه‌های تحقیق

مقایسه میانگین تعداد کل سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه در گروه بیمار، نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار آماری را نشان داد ($p < 0.01$). گروه

تجربی نسبت به گروه بیمار افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). گروه تجربی نسبت به گروه شم نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.001$) (نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه میانگین تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده در گروه‌های شاهد، بیمار، شم و تجربی در موش‌های صحرایی بیمار شده با جنتامایسین



تصویر ۳. مقاطع بافت‌شناسی از کلیه موش‌های صحرایی رنگ‌آمیزی شده با همتاکسیلین و اتوزین در گروه‌های شاهد، تیمار، شم و تجربی. پیکان آبی سلول‌های پوششی دیواره لوله‌های خمیده کلیه را نشان می‌دهد.

بحث

در تحقیق حاضر تاثیر تزریق پلاسمای غنی از پلاکت داخل کلیه در موش‌های صحرایی تیمار شده با جنتامایسین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که در موش‌های صحرایی مدل بیماری، جنتامایسین باعث کاهش معنی‌دار آماری تعداد کل سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه نسبت به گروه شاهد شد. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر که نشان دادند جنتامایسین باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده نزدیک در موش صحرایی می‌گردد همسو است [۱۷]. همچنین، برخی از محققین اظهار داشتند جنتامایسین در محیط‌های کشت باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های کلیوی می‌گردد [۱۸]. اندوسیتوز و تجمع جنتامایسین در لیزوزوم‌های سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده نزدیک باعث مرگ سلولی می‌گردد بدین ترتیب که با مهار فعالیت هضمی لیزوزوم‌ها منجر به تجمع فرآورده‌های سمی یا کاهش متابولیت‌های حیاتی شود. همچنین با از هم گسیختگی

غشاهای لیزوزومی باعث رهایی پروتئازهای فوق‌العاده فعال به داخل سلول می‌گردد که قادر به ایجاد مرگ سلولی می‌باشند. علاوه بر آن جنتامایسین با ورود به لیزوزوم‌ها، شبکه اندوپلاسمیک و کمپلکس گلژی با فسفولیپیدهای غشایی آنها باند شده ایجاد پدیده‌ای به نام فسفولیپیدوزیس می‌نماید که عملکرد صحیح فسفولیپازها را مختل نموده منجر به مرگ سلولی می‌گردد. بالارفتن غلظت جنتامایسین از حد آستانه در ساختارهای لیزوزومی باعث پارگی غشاهای آنها و آزادی محتوای داروی آنها به داخل سیتوزول می‌شود و محتوای جنتامایسین داخل سیتوزول می‌تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم روی میتوکندری‌ها تأثیر گذارده و مسیر داخل سلولی مرگ برنامه‌ریزی شده را فعال می‌کند [۱۹،۲۰].

طبق نتایج این مطالعه، در موش‌های صحرایی مدل بیماری، جنتامایسین باعث افزایش سطح ازت اوره خون و کراتینین سرم شد. این یافته با نتایج مطالعه دیگر پژوهشگران که نشان دادند جنتامایسین باعث افزایش سطح ازت اوره خون و کراتینین سرم

می‌گردد هم راستا می‌باشد. ازت اوره خون از متابولیسم پایانی پروتئین‌ها پدید می‌آید که در کبد ساخته شده و از کلیه‌ها دفع می‌گردد. کراتینین از کراتین و فسفو کراتین تولید می‌شود که در سیستم عضلانی اسکلتی وجود دارند. این متابولیت‌ها، اکثراً توسط لوله‌های خمیده کلیه دفع می‌شود و آسیب به کلیه مانع از دفع آن‌ها و در نتیجه باعث افزایش سطح ازت اوره خون و کراتینین سرم می‌شود [۲۱].

نتایج این مطالعه نشان داد سه روز بعد از درمان با PRP تعداد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج این پژوهش همسو با نتایج دیگر پژوهش‌ها می‌باشد که نشان دادند فاکتورهای رشد باعث افزایش بازسازی و ترمیم لوله‌های کلیوی می‌گردد. نتایج دیگر مطالعات نشان داده است که فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد تغییر شکل‌دهنده آلفا، هر دو رسپتور EGF را فعال می‌کنند. به دنبال اتصال این فاکتورهای رشد به رسپتور، مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی فعال می‌شود که نهایتاً پیام به هسته منتقل شده باعث میتوز و تکثیر سلولی می‌شود. همچنین دیگر مطالعات، افزایش بازسازی و ترمیم لوله‌های کلیه و بهبود عملکرد آن‌ها را پس از تجویز EGF را گزارش کردند [۵،۲۲].

یکی دیگر از فاکتورهای رشد موجود در PRP، فاکتور رشد شبه‌انسولینی-۱ است که پژوهش‌ها نشان داده‌اند، از طریق فعال سازی رسپتور فاکتور رشد اپیدرمی باعث افزایش بازسازی و ترمیم توبول‌های کلیه می‌شود [۷،۲۳].

از دیگر فاکتورهای رشد موجود در PRP، می‌توان به فاکتور رشد هپاتوسیستی اشاره کرد که با تحریک تکثیر و جلوگیری از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه، به عنوان یک فاکتور بقاء عمل می‌کند. افزودن HGF به محیط‌های کشت و یا ژن‌درمانی مانع از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی در برابر مواد

سمی می‌شود. در مطالعه دیگری که توسط زایت بر روی بیماران نارسای حاد کلیه انجام گرفت نشان داد که HGF باعث بهبود فیبروز در نارسای حاد کلیه می‌شود [۹].

فاکتور رشد هپاتوسیستی از طریق مکانیسم‌های دو گانه نقش آنتی‌آپوپتوتیک و بقاء سلولی خود را ایفا می‌کند. بدین صورت که با اتصال به رسپتور cmet (از خانواده رسپتورهای تیروزین کینازی) که در سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده بیان می‌شود، باعث القاء بیان پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک می‌شود. فاکتور رشد هپاتوسیستی، همچنین به عنوان یک فاکتور باززایشی، توانایی القاء تکثیر و تمایز سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی را دارد [۲۴،۲۵].

نتایج به دست آمده از انجام آزمایشات بیوشیمیایی بر روی سرم خون موش‌های صحرایی که PRP دریافت کرده بودند نشان داد که سطح ازت اوره خون و کراتینین سرم، سه روز بعد از PRP درمانی در مقایسه با گروه شاهد تغییری نکرد.

در مطالعه‌ای توسط کمپزینسکی^۱ و همکاران و نیز در مطالعه لن^۲ و همکاران و سافتی^۳ و همکاران انجام گرفت گزارش شد که سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده تکثیر یافته برای این که به بلوغ کامل برسند و فعالیت خود را شروع کنند به یک ماه زمان نیاز دارند [۲۶-۲۸]. بنابراین جهت بررسی کارکرد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده تکثیر یافته به یک ماه وقت نیاز است در حالی که در این تحقیق جهت بررسی تکثیر سلولی سه روز بعد از PRP درمانی، بافت کلیه برداشته شد، در همان زمان نیز نمونه خون گرفته شد و آنالیز گردید. به همین دلیل تغییرات مشهود کارکرد سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده تکثیر یافته مشاهده نشد.

¹ Kempczinski

² Lan

³ Safti

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد پلاسمای غنی از پلاکت بتواند تکثیر سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه آسیب دیده با جنتامایسین در موش‌های صحرایی را القاء کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از طرح پژوهشی مصوب دانشگاه علوم پزشکی قم تحت عنوان پلاسمای غنی از پلاکت بر ترمیم عروق کلیوی آسیب دیده توسط جنتامایسین در موش‌های صحرایی نر و با کد اخلاق IR.MUQ.REC.1397.7 می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی علوم پزشکی قم که هزینه‌های طرح را فراهم نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

به نظر می‌رسد فاکتورهای رشد و مواد بیولوژیک فعال موجود در پلاسمای غنی از پلاکت شامل $TGF-\alpha$ ، EGF، IGF-1 و HGF، پس از رهاس شدن در محیط خارج سلولی بافت، به رسپتورهای مخصوص خود بر روی سلول‌های موجود در بافت متصل شده، مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی را فعال نموده که نهایتاً پیام به هسته منتقل شده باعث القا میتوز و تکثیر سلول‌های پوششی لوله‌های خمیده کلیه آسیب دیده با جنتامایسین می‌گردد.

تحقیق حاضر با محدودیت‌های ذیل مواجه بود:

- ۱- عدم اندازه گیری میزان فاکتورهای رشد موجود در پلاسمای غنی از پلاکت؛
- ۲- عدم دسترسی به سونوگرافی جهت مشاهده مستقیم کلیه، جهت تزریق پلاسمای غنی از پلاکت،

References

- 1- Shahrbafe FG, Assadi F. Drug-induced renal disorders. J Renal Inj Prev. 2015 Sep;4(3):57.
- 2- Askari H, Zeinali F, Haghi-Aminjan H, Hafizi SM, Alirezaei A. The protective effects of *Ocimum basilicum* extract against gentamicin-induced nephrotoxicity in male rats; an anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-apoptotic action. Immunopathologia Persa. 2019 Mar;5(2):e21-e21.
- 3- Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Sokolovic D, Ilic I. Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives. EXCLI J. 2017 Mar;16:388-99.
- 4- Flaquer M, Romagnani P, Cruzado JM. Growth factors and renal regeneration. Nefrología. 2010 Jun;30(4):385-93.
- 5- Gao L, Zhong X, Jin J, Li J, Meng X-m. Potential targeted therapy and diagnosis based on novel insight into growth factors, receptors, and downstream effectors in acute kidney injury and acute kidney injury-chronic kidney disease progression. Signal Transduct Target Ther. 2020 Feb;5(1):9.
- 6- Kok HM, Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2014 Oct;10(12):700.
- 7- Cho KS, Ko IK, Yoo JJ. Bioactive compounds for the treatment of renal disease. Yonsei Med J. 2018 Nov;59(9):1015-25.
- 8- Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. HGF as a renoprotective and anti-fibrotic regulator in chronic renal disease. Front Biosci. 2008 May;13(1):7072-86.
- 9- Zayet GK. Serum hepatocytes growth factor in acute and chronic kidney disease patients and its relation to disease activity. JAPER. 2018 Jul-Sep;8(3):75.
- 10- Salem N, Helmi N, Assaf N. Renoprotective effect of platelet-rich plasma on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Oxid Med Cell Longev. 2018 Jul;2018.
- 11- Moghadam A, Khozani TT, Mafi A, Namavar MR, Dehghani F. Effects of platelet-rich plasma on kidney regeneration in gentamicin-induced nephrotoxicity. JKMS. 2017 Jan;32(1):13-21.
- 12- Abdelsameea AA, Mohamed AM, Amer MG, Attia SM. Cilostazol attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Clin J Am Soc Nephrol. 2016 Jan;68(4):247-53.

- 13- Cynthia A, Pekow, Baumans V. Common Nonsurgical Techniques and Procedures. In: Hau J, L G, Jr VH, editors. Handbook of Laboratory Animal Science 1. 2^{ed}. Boca Raton London New York Washington, D.C: CRC PRESS; 2003. p. 374-441.
- 14- Franco D, Franco T, Schettino AM, Tavares Filho JM, Vendramin FS. Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use. *Aesthetic Plast Surg*. 2012 Aug;36(5):1254-59.
- 15- Hogan JJ, Mocanu M, Berns JS. The native kidney biopsy: Update and evidence for best practice. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016 Feb;11(2):354-62.
- 16- Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol*. 1999 May;10(5):1100-23.
- 17- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Taper HS, Cumps J, Tulkens PM. Apoptosis in renal proximal tubules of rats treated with low doses of aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Mar;44(3):665-75.
- 18- El Mouedden M, Laurent G, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Gentamicin-induced apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblasts. *Toxicological sciences*. 2000 Jul;56(1):229-39.
- 19- Mather M, Rottenberg H. Polycations induce the release of soluble intermembrane mitochondrial proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2001 Jan;1503(3):357-68.
- 20- Morales AI, Detaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arevalo M, et al. Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney Int*. 2010 Feb;77(10):861-9.
- 21- Yarijani ZM, Najafi H, Madani SH. Protective effect of crocin on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2016 Mar;19(3):337.
- 22- Wang Z, Chen J-K, Wang S-w, Moeckel G, Harris RC. Importance of functional EGF receptors in recovery from acute nephrotoxic injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3147-54.
- 23- Lin J-J, Cybulsky AV, Goodyer PR, Fine RN, Kaskel FJ. Insulin-like growth factor-1 enhances epidermal growth factor receptor activation and renal tubular cell regeneration in postischemic acute renal failure. *J Lab Clin Med*. 1995 Jun;125(6):724-33.
- 24- Zhang J, Yang J, Liu Y. Role of Bcl-xL induction in HGF-mediated renal epithelial cell survival after oxidant stress. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008 Jan;1(3):242.
- 25- Zhang X, Li Y, Dai C, Yang J, Mundel P, Liu Y. Sp1 and Sp3 transcription factors synergistically regulate HGF receptor gene expression in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Jan;284(1):F82-F94.
- 26- El-Safti FE-NA, Mohammed SA. Light and electron microscopic studies of chronic renal failure using an adenine rat model. *Menoufia Medical Journal*. 2017 Jul;30(1):271.
- 27- Lan R, Geng H, Singha PK, Saikumar P, Bottinger EP, Weinberg JM, et al. Mitochondrial pathology and glycolytic shift during proximal tubule atrophy after ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Mar;27(11):3356-67.
- 28- Kempczinski R, Caulfield J. A light and electron microscopic study of renal tubular regeneration. *Nephron*. 1968 Jan;5(4):249-64.