www.magiran.com



# تخمین استریولوژیکی[1] تعداد گلومرول‌ها در مسمومیت کلیوی حاصل از داروی سیس پلاتین در کلیه موش صحرایی نر

دکتر عبدالرحمن دزفولیان[2] ـ دکتر حیات ممبینی[3] ـ دکتر شهلا ظهیری[4] ـ دکتر فرزانه دهقانی[5]
دکتر عبدالکریم منصوری[6]

چکیده :

**مقدمه :** سیس پلاتین دارویی است که به‌طور گسترده جهت درمان تومورهای بدخیم مانند سرطان‌های سر و گردن، تخمدان، مثانه، مری، ریه و انواع لوکمی‌ها به‌کار می‌رود. مصرف این ترکیب به علت عوارض جانبی متعددی که روی اعضای مختلف بویژه کلیه‌ها می‌گذارد محدود می‌باشد. از آنجا که سمیت کلیوی حاصل از این دارو تاکنون به لحاظ جنبه‌های بالینی (شواهد آزمایشگاهی و یافته‌های هیستوپاتولوژیکی) اثبات گردیده است، هدف از این تحقیق معرفی و به‌کارگیری تکنیک سه بعدی جهت مطالعهٔ تغییرات احتمالی در تعداد گلومرول‌های کلیوی پس از ایجاد سمیت مذکور می‌باشد.

**روش کار :** در این تحقیق ۳۰ رأس از موش‌های صحرایی نر از طریق نمونه‌برداری تصادفی، جداسازی شده و به گروه‌های ده‌تایی تقسیم گردیدند. به یک گروه سیس پلاتین به شکل دوز حاد و به میزان ۷/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم حل‌شده در سرم فیزیولوژی و به گروه کنترل معادل آن حلال دارو به تنهایی از طریق داخل صفاقی تزریق گردید. گروه سوم نیز دارو را به شکل مزمن آن به میزان ۱/۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به مدت ۵ روز متوالی دریافت نمودند. تمامی حیوانات به مدت ۹۶ ساعت پس از آخرین تزریق، بیهوش گردیده و سپس مورد کالبدشکافی قرار گرفتند و کلیه‌های راست آنها پس از تزریق در فیکساتور قرار داده شد و پس از انجام مراحل خاص آماده‌سازی جهت انجام تکنیک شمارنده فیزیکی و شمارش تعداد ذرات مورد نظر جهت مطالعه آماده گردیدند.

**نتایج :** تعداد کل گلومرول‌ها ۳۱۷۰۷، ۳۰۴۱۵ و ۳۰۸۰۲ و تراکم عددی آنها نیز به میزان ۱۶۲، ۱۱۹ و ۱۴۰ به ترتیب در گروه‌های کنترل، دوز حاد و دوز مزمن محاسبه گردیده است.

**نتیجه‌گیری :** هرچند به لحاظ هیستوپاتولوژیکی تغییرات بافتی به شکل نکروز سلولی بویژه در لوله‌های پروکسیمال و التهاب بافت بینابینی، آپاپتوز سلولی و در برخی موارد اسکلروز گلومرولی در گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دارو به وضوح نشان داده می‌شود لیکن گلومرول‌های کلیوی به لحاظ عددی تغییرات چندانی را نشان نداده و ثبات خود را در این خصوص نسبتاً حفظ می‌نمایند.

**واژگان کلیدی :** سیس پلاتین، مسمومیت کلیوی، گلومرول، شمارنده فیزیکی .

## مقدمه

سیس پلاتین یک کمپلکس غیرآلی و ترکیبی می‌باشد که مهارکنندهٔ سنتز دزوکسی ریبونوکلئیک اسید است و به گونه گسترده‌ای جهت درمان تومورهای بدخیم از جمله تومورهای متاستازدهندهٔ تخمدان، بیضه، بدخیمی‌های اپی‌تلیال، سرطان‌های سر و گردن، مثانه، مری، ریه و انواع لوکمی‌ها به کار می‌رود (۱و۲و۳). این دارو مشابه با سایر داروهای ضدسرطان، روی اعضای مختلف، عوارض جانبی متنوعی از خود به جای می‌گذارد. عمده‌ترین اختلال حاصله از آن نفروتوکسیسیتی می‌باشد(۴و۵و۶). مطالعات گسترده، نشانگر آن است که این ترکیب از طریق

1. Steriologic Stimation.

۲ و ۳ ـ عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.
۴ ـ عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی جهرم.
۵ ـ عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز.
۶ ـ عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی اهواز.

www.magiran.com



اتصالات کووالانتی با ماکرومولکول‌های کلیه موجب آسیب بافتی می‌گردد (۱۵و۵).

آسیب کلیوی حاصل از این ترکیب به لحاظ شاخص‌های آزمایشگاهی، با بالا رفتن سطوح غلظت کراتی‌نین و BUN سرم خون و همچنین به لحاظ هیستوپاتولوژیکی به شکل نکروز حاد سلولی در لوله‌های کلیوی بویژه لوله‌های مجاور نزدیک و ظهور پدیدهٔ آماس در بافت بینابینی و آپاپتوز سلولی تاکنون مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است (۲و۳و۴و۶).

در این مطالعه هدف ما یک بررسی و آنالیز کمی یابه کارگیری تکنیک استریولوژی در شمارش تعداد گلومرول‌های کلیوی قبل و پس از ایجاد مسمومیت می‌باشد. استریولوژی علمی است که هرچند سابقه‌ای طولانی دارد لیکن در چند سال اخیر راه خود را در حیطهٔ علوم تجربی به نحوی باز نموده و بالاخص در شاخهٔ سم‌شناسی و مطالعه اثرات جانبی دارو و مواد شیمیایی کاربرد فراوانی پیدا نموده است (۹و۱۱و۱۰).

در این علم با استفاده از تکنیک‌های خاص و فرمول‌های اثبات‌شدهٔ ریاضی و استفاده از علم آمار و احتمالات، می‌توان یک مطالعهٔ کمی و دقیق بر روی نمونه انجام داد و حتی در مواردی که سایر یافته‌ها نتوانند کمک چندانی بنمایند کمک مؤثری ارائه نموده است. در استریولوژی می‌توان جنبه‌های گوناگون مانند تعیین حجم عضو و بافت، تعیین تعداد ذرات خاص در نمونه، محاسبه سطح، طول و ... را بسته به موضوع مورد مطالعه انتخاب نمود و نتایج مطالعات را صرفاً از بعد کیفی خارج ساخته و به صورت تعداد و ارقام قابل اطمینان و دور از هرگونه سوگیری ارائه داد (۹و۱۰و۱۱و۱۲).

از این رو بر آن شدیم تا تأثیر سمیت این دارو را به لحاظ جنبه کمی و تغییراتی که احتمالاً در رابطه با تعداد گلومرول‌های کلیه رخ می‌دهد مورد بررسی قرار دهیم.

## روش کار

۳۰ سر از موش‌های صحرایی نر از نژاد اسپراکو دالی[1] با وزنی در حدود ۲۰۰ ـ ۲۴۰ گرم به عنوان حیوانات آزمایشگاهی انتخاب و از طریق نمونه‌برداری تصادفی ساده به سه گروه ده‌تایی تقسیم گردیدند. حیوانات به‌طور سه‌تایی در قفس مخصوص حیوانات و با چرخهٔ نوری ۱۲ ساعات روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند. برنامه غذایی حیوانات شامل غذای آمادهٔ حیوانات آزمایشگاهی، ساخت شرکت خوراک دام و طیور شوشتر و آب تصفیهٔ شهری بود.

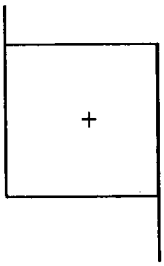
سپس داروی سیس پلاتین حل شده در سرم فیزیولوژی به صورت ویال آماده از شرکت بلون فرانسه خریداری شده و به گروهی از حیوانات به طریق داخل صفاقی به میزان ۷/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به صورت دوز حاد و در گروه دوم، هم حجم داروی تزریق شده، سرم فیزیولوژی تجویز شد. به گروه سوم دارو به شکل مزمن آن به میزان ۱/۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به مدت پنج روز متوالی و هر روز در زمان معین تزریق گردید. تمامی حیوانات پس از ۹۶ ساعت از آخرین تزریق، ابتدا در محفظهٔ حاوی اتر با غلظت ۱۰٪ جهت بیهوشی قرار داده شدند و پس از باز کردن شکم با استفاده از تکنیک نفوذ عروقی[2]، تثبیت‌کننده که شامل فرمالین با فرفسفات ۱۰٪ بوده به داخل بطن چپ آنها تزریق گردید و پس از نفوذ آن به داخل ارگان‌ها، کلیه‌های راست حیوان به دقت از محل جدا شده و پس از شستشوی مختصری با نرمال‌سالین، ابتدا توسط ترازوی حساس توزین گردیده و درون فیکساتور قرار داده شد. پس از ٤ روز و تعویض تثبیت‌کننده در طی این مدت، کلیه‌ها جهت مطالعات کمی مورد آماده‌سازی قرارگرفتند. بدین منظور و به جهت کاربرد تکنیک شمارنده فیزیکی، که یکی از تکنیک‌های مهم استریولوژی جهت شمارش تعداد ذرات خاص در یک نمونه می‌باشد، کلیه‌ها پس از فیکساسیون اولیه درون محلول آگار ۷٪ ، قالبگیری شده و بلوک‌های مکعبی‌شکل حاصله بر روی دستگاه ماکروتوم بافتی طراحی شده قرارگرفتند(۱۱) و عضو مورد نظر به نحوی که محور طولی آن عمود بر صفحهٔ برش باشد به قطعات یک میلیمتری تقسیم گردید. سپس با حفظ موقعیت و جهت، برای تمامی برش‌های به‌دست آمده، مراحل آماده‌سازی بافت انجام و پس از قالب‌گیری برش‌ها از هر کدام دو اسلاید ۵ میکرونی براساس طرح نمونه‌برداری استریولوژیکی تهیه و توسط روش معمولی هماتوکسیلین ـ ائوزین رنگ‌آمیزی گردیدند. از آنجا که شمارنده یک کاوشگر سه بعدی است که شمارش ذرات مورد نظر را بدون توجه به اندازه و شکل آنها صورت می‌دهد و

1. Spraque-Dwally.
2. Perfusion Vascular Technique.

www.magiran.com

شامل سیستم آزمون و شمارش با قوانین خاص خود است و با استفاده از دو مقطع موازی با یک زوج شمارنده به عنوان پروبی سه بعدی صورت می‌پذیرد(۹و۱۰و۱۱)، لذا در مرحله میکروتومی از هر اسلاب به‌دست آمده دو برش ۵ میکرومتری به نحوی که اولین برش به‌طور تصادفی تهیه گردد، به دست آمد.

دو مقطع زوج موازی به‌طور همزمان بر روی دستگاه میکروسکوپ پروژکتینگ قرار داده شد و سپس با استفاده از سیستم آزمون مربوطه شمارش انجام گردید (شکل ۱).



شکل ۱

در این مطالعه جهت شمارش تعداد گلومرول‌های کلیوی از دو دستگاه میکروپروجکتینگ[1] استفاده شد. دو مقطع زوج موازی انتخاب و مقطع اول به عنوان مرجع و مقطع دوم به عنوان شاهد به گونه‌ای روی دو دستگاه تنظیم گردید که فیلدهای مورد مطالعه یکسان باشند. سپس از شبکه‌ای متشکل از چهار فریم که ابعاد هر فریم $\Delta x = ٤/٨٥$ سانتی‌متر و $\Delta y = ٥$ سانتی‌متر بود استفاده گردید و برای هر مقطع چهار بار این شبکه بر روی فیلدهای مورد مشاهده به صورت تصادفی منطبق گردید. بزرگنمایی خطی میکروسکوپ ۱۳۰ و ارتفاع شمارنده مربوطه ١٤ میکرومتر درنظرگرفته شد و با در نظرگرفتن قوانین مربوط به شمارش، بدین نحو که چنانچه گلومرولی در داخل فریم‌ها یا روی خطوط نقطه‌چین قرار می‌گرفت، محاسبه و چنانچه خارج از این محدوده بود یا روی خطوط توپر بود، از آن صرف‌نظر می‌گردید. تعداد گلومرول‌هایی که در مقطع دوم مشاهده نمی‌شوند شمارش و $\Sigma Q$ به‌دست آمد و $\Sigma P$ نیز که تعداد فریم‌هایی بود که در فضای مرجع مشاهده و محاسبه می‌شد و از فرمول مربوطه، میزان $N_V$ محاسبه و سپس با ضرب کردن این دانسیته در حجم مرجع که در این تحقیق حجم فضای کورتکس منظور گردیده بود، تعداد کل گلومرول‌ها به‌دست آمد.

رابطه ریاضی مورد استفاده جهت تعیین دانسیته عددی گلومرول‌ها عبارت است از :

$$N_V = \frac{\Sigma Q}{a/f.h.\Sigma P}$$

$N_V$ = دانسیته عددی ذرات

$\Sigma Q$ = مجموع ذرات شمارش شده

$\Sigma P$ = مجموع نقاط همراه فریم که با فضای مرجع برخورد داشته‌اند

h = ارتفاع شمارنده (حداقل باید یک سوم قطر ذره مورد نظر باشد)

a/f = مساحت هر فریم

پس از تعیین دانسیته عددی گلومرول‌ها با ضرب نمودن آن در حجم مرجع تعداد کل گلومرول‌ها به دست می‌آید :

$$N_{Tut} = N_V \times V_{Ref}$$

$N_{Tot}$ = تعداد کل ذرات مورد نظر

$N_V$ = دانسیته عددی ذرات

$V_{Ref}$ = حجم فضای مرجع

ضریب خطای استریولوژیک یک روش ریاضی سودمند جهت نشان دادن میزان شک و تردید در ارتباط با تخمین مورد نظر می‌باشد که معمولاً تا حدود ۱۰٪ قابل قبول است.

محاسبه ضریب خطای استریولوژیک در مطالعه حاضر در رابطه با تعیین دانسیته عددی گلومرول‌ها صورت گرفته که در جدول نتایج نشان داده شده است.

## نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از آماره «من - ویتنی - یو»[2] و با در نظرگرفتن سطح معنی‌دار ۰/۰۵ زیر منحنی، آنالیز گردیده و در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است.

1. Microprojecting.
2. Mann-Withney-U.

www.magiran.com



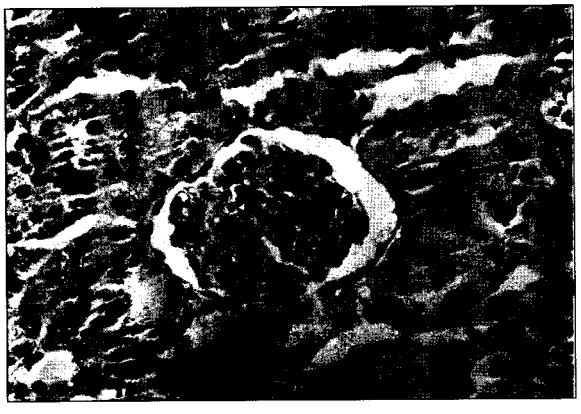
جدول شماره ۱ ـ مقایسه اثر سیس‌پلاتین بر تراکم نسبی ($N_V$) و تعداد کل گلومرول‌های کلیوی ($N_{Tot}$) در رات

| گروه | تعداد کل گلومرول‌ها ($N_{Tot}$) | $CE_{(N_V)}$ | تراکم نسبی $N_V$ |
|---|---|---|---|
| سرم فیزیولوژی کنترل (I) | ۳۱۷۰۷/۱۱ ±۲۷۶۵/۱۴ | ۰/۰۶ | ۱۶۲/۹۳ ±۲۰/۳۲ |
| سیس پلاتین (دوز حاد II) | ۳۰۴۱۵/۱۵ ±۵۹۰۱/۷۸ | ۰/۰۴ | ۱۱۹/۷ ±۱۶/۶۴[a] |
| سیس پلاتین (دوز مزمن III) | ۳۰۸۰۲/۸۴ ±۲۱۲۰/۳۸ | ۰/۰۳ | ۱۴۰/۷۱ ±۵/۰۶[a] |

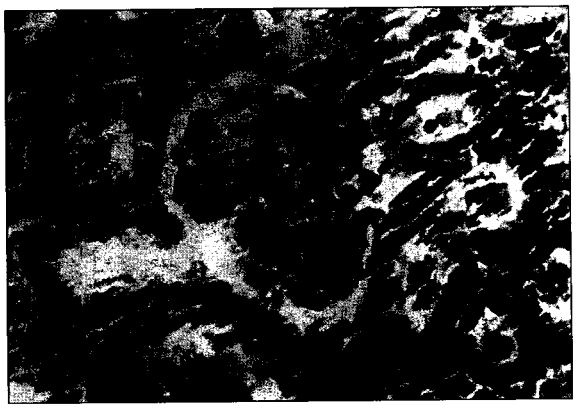
(a: اختلال معنی‌دار با گروه کنترل $p<0/05$)

شکل ۲ ـ فتومیکروگراف نوری از کورتکس کلیه موش صحرایی نر دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی، بافت کلیه سالم، سلول‌های لوله‌های پروکسیمال و دیستال و جسمک کلیوی فاقد آسیب رنگ‌آمیزی (H&E) (×۱۰۰۰)

شکل ۳ ـ فتومیکروگراف نوری از بافت مدولای کلیه موش صحرایی نر دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی، بافت کلیه سالم سلول‌های لوله جمع‌کننده و هنله فاقد آسیب سلولی رنگ‌آمیز (H&E) (×۴۰۰)



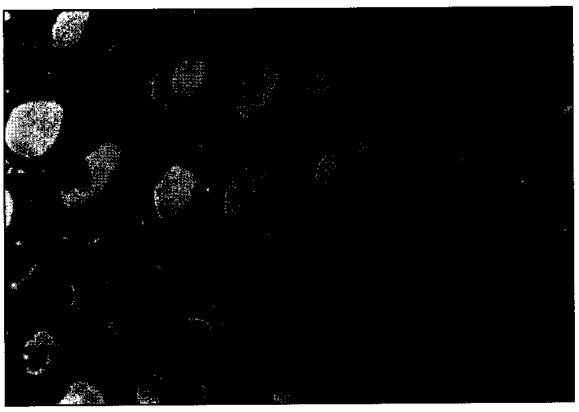
شکل ۴ ـ فتومیکروگراف نوری از کورتکس کلیه موش صحرایی نر، دریافت‌کننده دارو به شکل مزمن (۱/۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم)، آسیب سلولی، تورم سلولی، کاهش قدرت رنگ‌پذیری در سلول‌های اپی‌تلیومی لوله‌ها، ریزش سلول‌های هیپرتروفی در جسمک قابل مشاهده است. آسیب‌ها در مقایسه با شکل ۵ کمتر است. رنگ‌آمیزی (H&E) (×۴۰۰)



شکل ۵ ـ فتومیکروگراف از بافت کورتکس کلیه موش صحرایی نر، دریافت‌کننده دارو به شکل حاد (۷/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم)، آسیب شدید سلولی شامل تورم سیتوپلاسم و هسته، کاهش قدرت رنگ‌پذیری در سلول‌های اپی‌تلیومی لوله‌های کلیوی و ریزش سلول‌های لوله هیپرتروفی در جسمک قابل مشاهده است. رنگ‌آمیزی (H&E) (×۴۰۰)

www.magiran.com





شکل ۶ ـ فتومیکروگراف نوری از بافت مدولای کلیه موش صحرایی نر، دریافت‌کننده دوز مزمن (۱/۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم)، آسیب بافتی به شکل تجمع کاست‌ها در لوله‌ها و ارتشاح سلولی قابل‌مشاهده است. رنگ‌آمیزی (H&E) (۴۰۰×)

## بحث

همچنان که تاکنون مشخص گردیده است، تخمین تعداد و اندازهٔ گلومرول‌ها برای تشخیص و تعیین پیش‌آگهی و چگونگی پیشرفت ضایعات در بسیاری از ناراحتی‌های کلیوی مانند تنگی شریان کلیوی و اسکلروز گلومرولی روش مناسبی می‌باشد(۷و۸). هرچند تحقیقات نشان داده که در روند برخی بیماری‌های مزمن، گلومرول‌ها بدون آنکه اثری از خود به جای گذارند ناپدید می‌شوند(۷و۸و۱۲و۱۳). از طرفی میزان پالایش کلیوی، وابستگی مستقیم به تعداد، قطر و سلامت گلومرول‌های کلیوی دارد و در واقع تغییرات عمده در توده کلیوی با پیشرفت بیماری‌های کلیوی ارتباط مستقیم دارد(۷و۸). همچنین ملاحظه گردید که در حیواناتی که فشار خون را به صورت مدل آزمایشگاهی ایجاد می‌نماییم، در مقایسه با گروه کنترل کاهش تعداد گلومرول‌ها پدید می‌آید(۸). همچنین به دنبال عدم تشکیل یک‌طرفه و یا برداشت کلیه، زمینه برای بروز ضایعاتی نظیر اسکلروز گلومرولی پدید می‌آید که با کاهش تعداد گلومرول‌ها همراه است(۸و۷). نتایج تحقیق اخیر نشان می‌دهد که هرچند مسمومیت کلیوی حاصل از مادهٔ ضدسرطان سیس‌پلاتین به شکل افزایش BUN و کراتی‌نین سرم و آسیب در بافت کلیوی کاملاً محرز و اثبات شده است(۶و۱۵ـ۱)، شمارش تعداد کل گلومرول‌ها در بافت کلیوی اختلاف معنی‌داری را در گروه‌های آزمایشی اعم از گروه دریافت‌کننده دوز حاد دارو و یا گروهی که آن را به شکل مزمن دریافت داشته‌اند، نسبت به گروه کنترل نشان نمی‌دهد. به نظر می‌رسد این عدم تغییر در تعداد گلومرول‌ها یکی به آن سبب است که تعداد نفرون‌ها در مدت کوتاهی پس از تولد، نسبتاً ثابت می‌ماند و این ثبات در طول عمر حفظ می‌شود و علت دیگر آنکه، تغییر در تعداد گلومرول‌ها باتوجه به مدت زمان نسبتاً کوتاهی که بین تزریق دارو و کشتن حیوانات، اتفاق نیفتاده و شاید چنانچه این مدت طولانی‌تر می‌شد تغییر در این پارامتر رخ می‌داد. بدین ترتیب جهت بررسی این موضوع به تحقیقات بیشتری نیاز است.

## منابع


1. Goodman V., Gliman V., The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed., NewYork: MacGraw-Hill, 1995, 1269-71.
2. Reynolds J.E.F., Martindale F., The Extra Pharmacopoea, 5th ed., Royal pharmaceutical Society, London 1996, 513-15.
3. Granick M.B., Mayer R.J., Abelson H.T., Acute renal failure associated with center treatment. In: Lazarus S.M., Brenner B.M., Acute renal failure, 3rd ed., London, Churchill Livingstone Inc., 1998, pp: 527-38.
4. Lau A.H., Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxicity injury, Kidney Int. 1999; 56(4): 1295-98.
5. Ban M., Hettich D., Huguet N, nephrotoxicity mechanism of cisplatinum (II) diamine chloride in Mice. Toxicol. Lett. 1994; 71(2): 161-68.
6. Masatoshi I., Masahide N., Hideki W., et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity and the protective effect of fosfomycin. Acute Obstes Czynecol. Scand., 1997; 76: 590-95.
7. Basagen J.M., Steffes M.W., Stillman A.E., et al. Estimation of glomerular number in situ using magnetic

www.magiran.com



resonance imaging & biopsy. Kid. Int., 1994; 45: 1668-72.

8. Stov K., Nyengard J.R., Korsgaard N., et al. Number and size of renal glomerull in spontaneously hypertensive rats. J. Hypertnes., 1994; 12(2): 1373-76.
9. Howard C.V., Reed C.E., Unblased sterology, 4th ed., Bios Scientific Publishers, 1998, pp: 69-106.
10. Gundersen H.J.G., Bendsten T.F., Korb L., et al. Some new simple and efficient stereplogical methods and their use in pathological research and diagnosis APMISS, 1988; 96: 394-97.
11. Dezfullian A.R., Microscopical application of design based stereological methods in histopathology and toxic-pathology, Ph. D. thesis, the University of Liverpool: 1995.
12. Bertram J.F., Sossaipillai M.C., Ricardo S.D., et al., Total numbers of glomerulli and individual glomedular cell types on the normal rats kidney. Cell Tissue Res., 1992; 270(1): 37-45.
13. Nyengard J.R., Number and dimensions of rat glomerular capillaries in normal development and after nephroctomy. Kidney Int., 1993; 43(5): 1049-57.
14. Merove M., Graeme B. and Bertran F., Biphasic glomerular hyperthrophy in rats administrated puromycin aminonucloside Kid. Int., 1996; 50: 768-75.

۱۵ ـ احمدی‌زاده، م. و حیدری‌فرد، م.، بررسی توکسیسیتی هپارین و نقش گلوتاتیون بر آسیب‌های حاصله از این دارو در موش‌های صحرایی نر، پژوهش در پزشکی، دی و اسفند ۱۳۷۶، شماره ۴، ۱۷ تا ۲۶.