بررسی آسیب کلیوی پذیرنده پس از انتقال لکوسیت‌ها از موش سوری Inbred مبتلا به ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیوی

مهری کدخدایی[1*]
حسین خواستار،[2] بهجت سیفی[1]
عاطفه نجفی،[3] فاطمه دلاوری[1]

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.
۳- گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
تلفن: ۶۴۰۵۳۲۸۸-۰۲۱
E-mail: kadkhodm@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۶/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: در مطالعه قبلی ما نقش انتقال لکوسیت‌ها را در القای آسیب کبدی به‌دنبال ایسکمی- خون‌رسانی مجدد (IR) کلیوی در موش سوری Inbred نشان داده شد. مطالعه حاضر نقش انتقال لکوسیت‌ها را از موش مبتلا به آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد (۶۰ دقیقه انسداد دو طرفه شریان کلیوی و سه ساعت پرفیوژن مجدد) در ایجاد آسیب کلیوی در موش پذیرنده بررسی می‌نماید. ***روش بررسی:*** موش‌ها در دو گروه Sham و IR قرار گرفتند. پس از بیهوشی و برداشت خون و بافت کلیوی، لکوسیت‌ها از خون جدا شده و به دو گروه پذیرنده منتقل شدند: موش‌های پذیرنده که لکوسیت‌های گروه شم را دریافت کردند (Sham recipient) و موش‌های پذیرنده که لکوسیت‌های گروه IR را دریافت نمودند (IR recipient). بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌های خون و بافت کلیه جمع‌آوری شد. ***یافته‌ها:*** در گروه IR recipient نسبت به گروه Sham recipient میزان مالون دی آلدهاید (MDA) بافت کلیه به‌طور معنی‌دار افزایش و گلوتاتیون و سوپراکسید دیسموتاز کاهش یافتند. Blood Urea Nitrogen (BUN) و کرآتینین پلاسما اگرچه در گروه IR donor با شم تفاوت معنی‌داری داشت ($P<0/05$) ولی در دو گروه پذیرنده تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. بافت کلیه در گروه IR donor در مقایسه با گروه Sham donor آسیب‌های بسیاری را نشان داد. اما گروه IR recipient اگرچه با گروه شم مربوطه بسیار متفاوت است ولی با گروه IR donor هم تفاوت بسیاری دارد. ***نتیجه‌گیری:*** این یافته‌ها لکوسیت‌ها را به عنوان یک عامل دخیل در آسیب بافتی و القای استرس اکسیداتیو در آسیب IR کلیه مطرح می‌نماید.

کلمات کلیدی: کلیه‌ها، آسیب ایسکمی، پرفیوژن مجدد، لکوسیت‌ها، استرس اکسیداتیو.

مقدمه

آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد (IR) Ischemia-Reperfusion کلیوی در بسیاری از موارد کلینیکی مانند شوک، پیوند اعضا، عفونت و جراحی‌های عروق ایجاد می‌شود که در نهایت می‌تواند منجر به نارسایی حاد کلیوی (ARF) و مرگ و میر قابل توجه ناشی از آن گردد، چنان‌که علی‌رغم پیشرفت بسیار در امر پیوند کلیه، مرگ و میر (Mortality) بیماران به علت آسیب کلیوی هم‌چنان بالا می‌باشد.[1] پیشنهاد شده که IR کلیوی موجب القا تولید سایتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF-α، بیان مولکول‌های چسبنده گوناگون، فعال شدن لکوسیت‌ها و ورود آن‌ها به داخل بافت کلیه می‌شود[2و3] و سایتوکین‌ها به‌خصوص TNF-α، خود با فعال کردن لکوسیت‌ها نقش مهمی در گسترش آسیب ناشی از ایسکمی دارند.[4و5] آسیب ناشی از IR یک اندام موجب پاسخ التهابی سیستمیک می‌گردد که در نتیجه آن آسیب در اندام‌های دور دست دیگر مانند قلب، ریه، روده و کبد ایجاد می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که IR کلیوی نیز موجب اختلال در اندام‌های دیگر مانند مغز، ریه و کبد می‌گردد.[6-8] در مورد نقش IR کلیوی در آسیب اندام‌های دوردست مطالعات بسیار اندکی انجام شده که صرفاً وجود آسیب را در آن اندام نشان داده‌اند ولی مکانیسم ایجاد ضایعه بررسی نشده است. با توجه به شیوع و مخاطره‌های IR کلیوی و به‌دلیل اهمیت کلیه در حفظ سلامت و نگه‌داری ثبوت محیط داخلی بدن، بررسی مکانیسم IR کلیوی در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]

ایجاد آسیب‌های موضعی دوردست (Remote) دارای اهمیت خاصی می‌باشد. سالیان زیادی است که نقش لکوسیت‌ها را در ضایعات IR اندام‌های مختلف مانند ریه، قلب، مغز، کلیه، کولون و کبد بررسی و تأیید کرده‌اند.[۹-۱۱] در یک مطالعه اخیر ما موفق شدیم نقش انتقال لکوسیت‌ها را در القای آسیب کبدی به‌دنبال ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیوی در موش سوری Inbred نشان دهیم.[۱۲] مطالعه حاضر نقش انتقال لکوسیت‌ها را از موش مبتلا به آسیب IR کلیوی در ایجاد آسیب کلیوی در موش پذیرنده بررسی می‌نماید. در این مطالعه پس از ۶۰ دقیقه ایسکمی دوطرفه شریان کلیوی و خون‌رسانی مجدد سه ساعته نمونه خون محیطی از موش‌ها گرفته و سپس لکوسیت‌های آن ایزوله و به موش‌های سالم تزریق شد تا اثر این لکوسیت‌ها بر وضعیت عملکردی، بافتی و استرس اکسیداتیو کلیه موش‌های سالم نشان داده شود. نتایج این پژوهش به‌طور اختصاصی نقش لکوسیت‌ها را در ایجاد آسیب کلیه به‌دنبال IR کلیوی ارزیابی می‌کند.

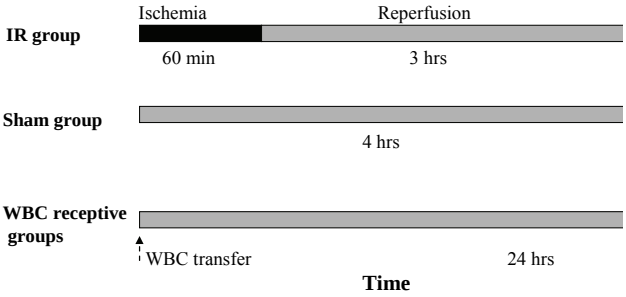
روش بررسی

این مطالعه بنیادی در سال ۱۳۸۹ در گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است. تعداد ۳۲ سر موش سوری BALB/c نر در محدوده وزنی ۳۵-۲۵ گرم به‌طور تصادفی انتخاب و به چهار گروه هشت تایی تقسیم شدند: ۱- گروه IR، دهنده لکوسیت (IR donor). ۲- گروه Sham، دهنده لکوسیت (Sham donor). ۳- گروه دریافت‌کننده لکوسیت از IR donor (IR recipient). ۴- گروه دریافت‌کننده لکوسیت از Sham donor (Sham recipient). دو گروه اول موش‌ها توسط تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (Sigma, Co, USA، ۶۰mg/kg) بیهوش شدند. در تمام این مدت درجه حرارت بدن حیوان کنترل‌شده و فشار شریانی توسط Tail cuff اندازه‌گیری شد. سپس تحت شرایط استریل برشی در خط وسط روی شکم ایجاد گردید. در گروه IR donor، با استفاده از کلمپ بولداگ ۶۰ دقیقه ایسکمی دوطرفه شریان کلیوی داده شد و پس از آن سه ساعت خون‌رسانی مجدد برقرار گردید. تغییر رنگ کلیه‌ها نشان‌گر تایید و رفع انسداد شریان کلیوی می‌باشد. در گروه Sham donor نیز تمام اعمال جراحی فوق انجام شده اما شریان‌ها کلمپ نگردید. در انتهای آزمایش نمونه خون محیطی از قلب حیوانات گرفته شده و بافت کلیه نیز جمع‌آوری شد. میزان BUN و کراتینین پلاسما به‌عنوان شاخص‌های آسیب عملکرد کلیوی اندازه‌گیری شد. بافت کلیه برای بررسی بافت‌شناسی و اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیداتیو خارج شده و پس از شستشو در محلول بافر فسفات سالین (PBS) به دو بخش تقسیم گردید که نیمی از آن، جهت آزمایشات بافت‌شناسی در محلول فرمالین ۱۰٪ فیکس گردیده و نیم دیگر برای تعیین میزان مالون دی آلدهاید (MDA) Malondialdehyde و سوپر اکساید دیسموتاز (SOD) Superoxide Dismutase کاتالاز، گلوتاتیون توتال و (FRAP) Ferric Reducing Antioxidant Power تا روز آنالیز در $^{\circ}C$ ۷۰- نگه‌داری شد.

آماده‌سازی و انتقال لکوسیت‌ها به موش‌های پذیرنده (Recipient): نمونه خون جمع‌آوری شده از قلب موش‌های گروه‌های دهنده (یک و دو) به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در $^{\circ}C$ ۴ سانتریفوژ شد. بعد از برداشتن پلاسما، به باقیمانده جهت لیز اریتروسیت‌ها به نسبت یک به ۱۰ محلول کلرید آمونیوم اضافه و پنج دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شد. سپس برای ختم واکنش ۲۰ الی ۳۰ میلی‌لیتر بافر فسفات به آن اضافه و بعد از سانتریفوژ مجدد در ۱۲۰۰rpm، لکوسیت‌های ته‌نشین شده دو بار با بافر فسفات شستشو داده شد. رسوب با ۵۰۰ میکرولیتر نرمال سالین رقیق شده و در واحد حجم با تکنیک رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Trypan blue exclusion technique) شمارش گردید. ۵×۱۰^{۶} لکوسیت از گروه یک IR donor به گروه سه (IR recipient) و همین تعداد لکوسیت از گروه دو (Sham donor) به گروه چهار (Sham recipient) توسط تزریق از راه ورید دمی انتقال داده شد.

روش نمونه‌گیری از حیوانات پذیرنده لکوسیت‌ها: حیوانات پس از مدت ۲۴ ساعت با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۶۰mg/kg) بیهوش شدند و نمونه خون وریدی از ورید اجوف تحتانی به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های عملکردی کلیه گرفته شد. سپس کلیه چپ در آورده شد و پس از شستشو در محلول بافر فسفات سالین (PBS) قسمتی از کلیه برای بررسی‌های مورفولوژیک در فرمالین ۱۰٪ فیکس گردید. بقیه آن برای یخ زدگی سریع بلافاصله به‌داخل نیتروژن مایع گذاشته شد و سپس جهت اندازه‌گیری شاخص‌های ذکر شده در بالا تا زمان آنالیز در فریزر $^{\circ}C$ ۷۰- نگه‌داری شد. برای تهیه پلاسما، نمونه‌های خون با دور ۴۰۰۰ به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]



خلاصه مراحل مطالعه که زمان انتقال لکوسیت‌ها به موش‌های سالم و خاتمه پروتکل و زمان نمونه‌گیری را نشان می‌دهد.

مدت ۱۰ دقیقه در دمای C° ۴-۰ سانتریفوژ شد. تمام نمونه‌ها تا زمان آنالیز در فریزر C° ۷۰- نگه‌داری شدند.

بررسی تغییرات فشار سیستولیک: در طی جراحی فشار سیستولیک و ضربان قلب در گروه IR donor و گروه Sham donor توسط Tail cuff متصل به دستگاه Power lab مانیتور و ثبت گردید.

بررسی بافت‌شناسی کلیه‌ها: کلیه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس و پس از آب‌گیری در پارافین قالب‌گیری گردیدند. از این کلیه‌ها مقاطع بافتی (چهار میکرومتر) تهیه و با ائوزین و هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شد. بررسی مقاطع بافتی با میکروسکوپ نوری انجام گردید. همه مقاطع کلیه حداقل در ۱۰ حوزه تصادفی که با هم تداخل نداشتند با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ مشاهده شدند. میزان آسیب به صورت واکوئوله شدن و انهدام سلول‌ها، انهدام توبول‌ها، حضور Cast های لومینال و مواد پروتیینی و از دست رفتن لبه بروسی توبول پروگزیمال می‌باشند. در این تحقیق نتایج براساس برنامه آماری SPSS ویراست ۱۰ و توسط Unpaired t- test انجام شد. داده‌ها به‌صورت Mean±S.E.M گزارش گردید و اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

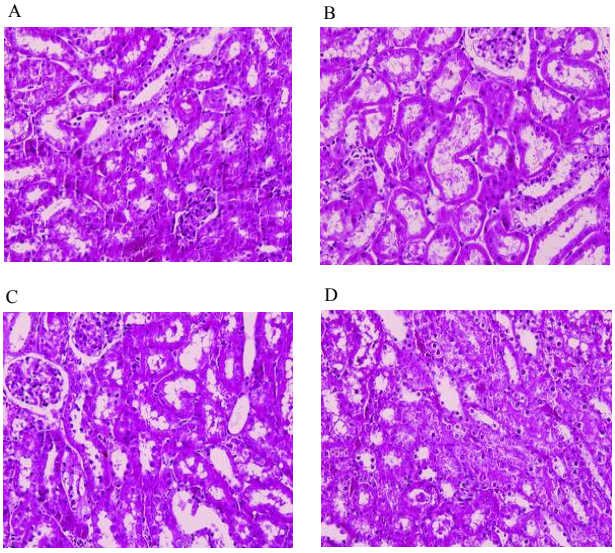
یافته‌ها

بررسی تغییرات فشار سیستولیک در گروه‌ها: تفاوت معنی‌داری بین میانگین فشار سیستولیک در گروه‌ها مشاهده نگردید.

بررسی تغییرات شاخص‌های عملکردی کلیه در گروه‌ها: غلظت BUN در پلاسمای گروه IR donor افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه Sham donor داشت (نمودار ۱a). به این ترتیب در این تحقیق نارسایی حاد کلیه ایسکمیک سبب القای آسیب عملکردی کلیه گردید. در گروه‌های IR recipient و Sham recipient تفاوت معنی‌داری در غلظت پلاسمایی BUN ملاحظه نشد (نمودار ۱b).

غلظت کراتینین پلاسما در گروه IR donor افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه Sham donor داشت (نمودار ۱a). افزایش کراتینین نشان‌دهنده آسیب عملکردی کلیه در گروه IR donor می‌باشد. در گروه‌های IR recipient و Sham recipient تفاوت معنی‌داری در غلظت پلاسمایی کراتینین ملاحظه نشد (نمودار ۱b).

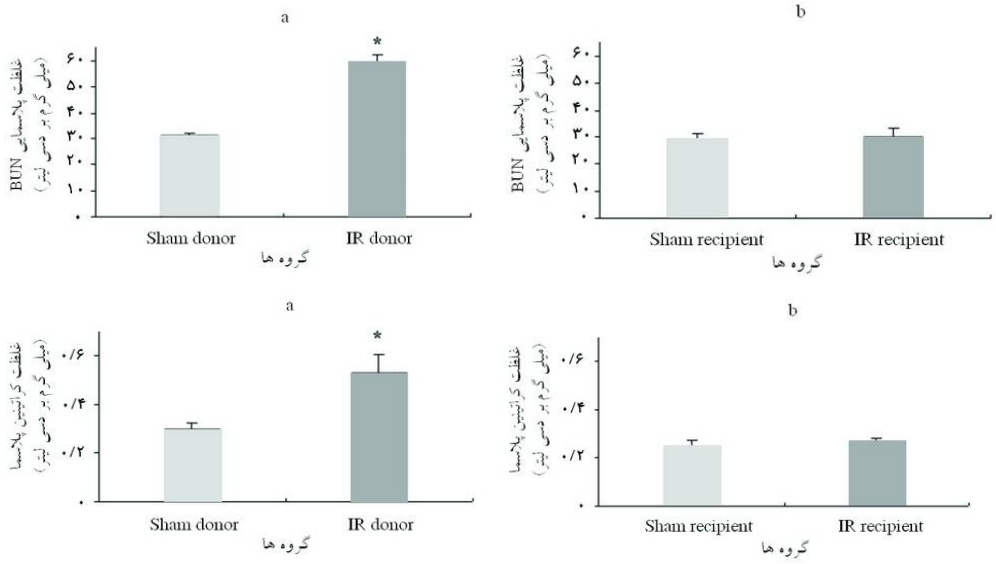
بررسی تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو کلیه در گروه‌ها: میزان مالون دی‌آلدهاید (MDA) در بافت کلیه گروه IR donor افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه Sham donor داشت (نمودار ۲a). به این ترتیب در این تحقیق میزان MDA به عنوان شاخص ایجاد استرس



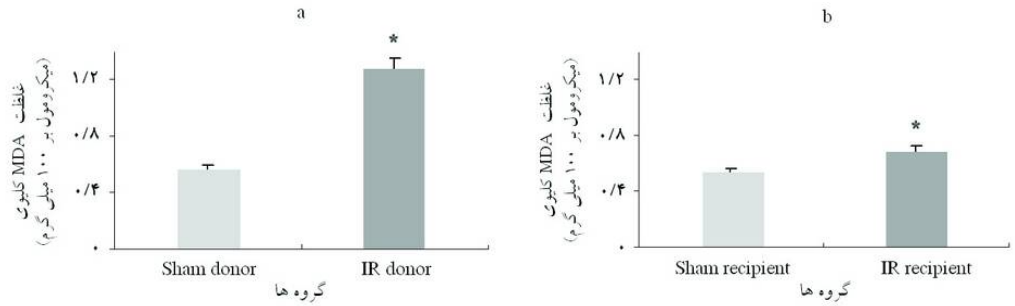
شکل- ۱: تغییرات هیستولوژی کلیه در گروه‌های مختلف. بزرگ‌نمایی: × ۴۰۰. A: گروه IR donor، B: گروه Sham donor، C: گروه IR recipient و D: گروه Sham recipient. گروه IR donor در مقایسه با گروه Sham donor آسیب‌های بسیاری را نشان داد. این تغییرات شامل انهدام گسترده توبول‌ها، نکروز نسبتا وسیع به‌خصوص در توبول‌های پروگزیمال، وجود انسداد توبولی قابل ملاحظه به‌ویژه در توبول‌های انتهایی‌تر، کم شدن ضخامت سلول‌ها و تحت فشار بودن سلول‌های اپیتلیال توبولی می‌باشد. در گروه Sham recipient، اگرچه مقداری از ضخامت سلول‌ها کم شده و تا حدی حاشیه‌های لومینال سلول‌ها Attenuation نشان می‌دهند ولی انهدام سلول‌ها و آسیب غیر قابل برگشتی وجود ندارد. در گروه IR recipient، نسبت به گروه شم مربوطه واکوئله شدن سلول‌ها و تشکیل مقادیری رسوب درون توبول‌ها به چشم می‌رسد اما توبول‌ها هنوز دست نخورده هستند و تغییر غیر قابل برگشتی از جمله نکروز توبولی دیده نمی‌شود. در مجموع این گروه در آغاز گسترش آسیب بافتی است و تفاوت بسیاری با گروه IR donor دارد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]

اکسیداتیو در بافت کلیه پس از القای نارسایی حاد کلیه ایسکمیک افزایش یافت. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری در میزان MDA بافت کلیه در گروه‌های IR recipient و Sham recipient دیده شد (نمودار ۲b). به این ترتیب انتقال لکوسیت‌های گروه IR donor به گروه IR recipient سبب افزایش میزان MDA در این گروه گردید. میزان گلوتاتیون (Total glutathione) در بافت کلیه گروه IR donor کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه Sham donor داشت (نمودار ۳a). به این ترتیب در این تحقیق کاهش میزان گلوتاتیون به عنوان ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت کلیه پس از القای نارسایی حاد کلیه ایسکمیک تلقی گردید. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری در میزان گلوتاتیون بافت کلیه در گروه‌های IR recipient و Sham recipient دیده شد (نمودار ۳b). به این ترتیب انتقال لکوسیت‌های گروه

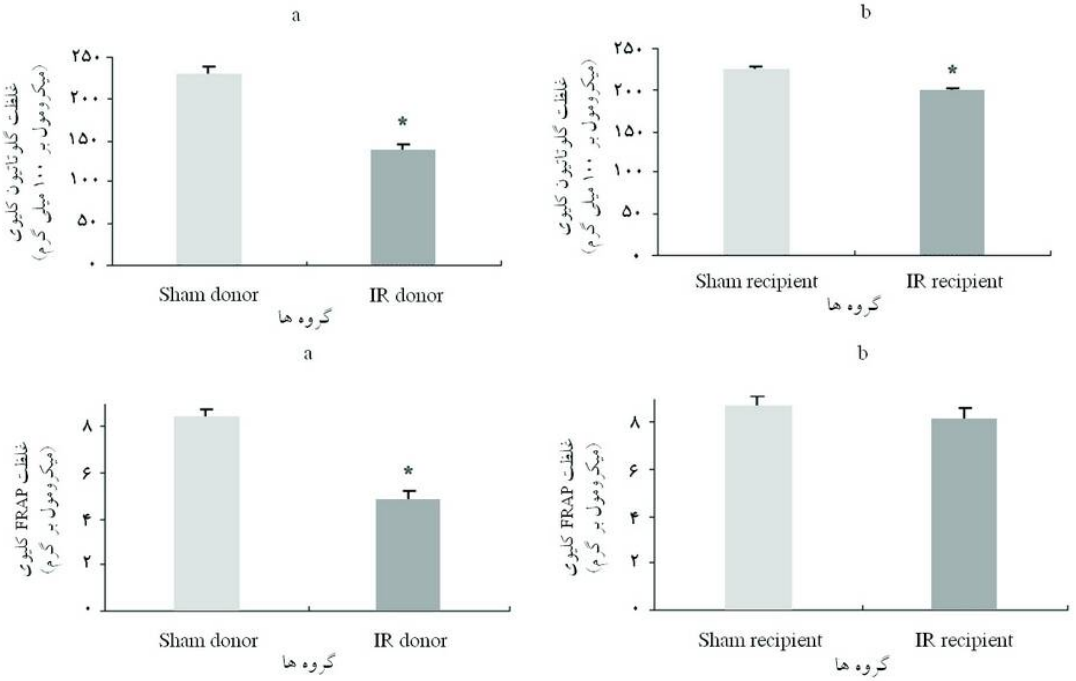


نمودار- ۱: تغییرات غلظت BUN و کراتینین پلاسما در گروه‌های مختلف. a) مقایسه IR donor و Sham donor، b) مقایسه IR recipient و Sham recipient. ستون‌ها نمایانگر میانگین± خطای معیار می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham donor در سطح P<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

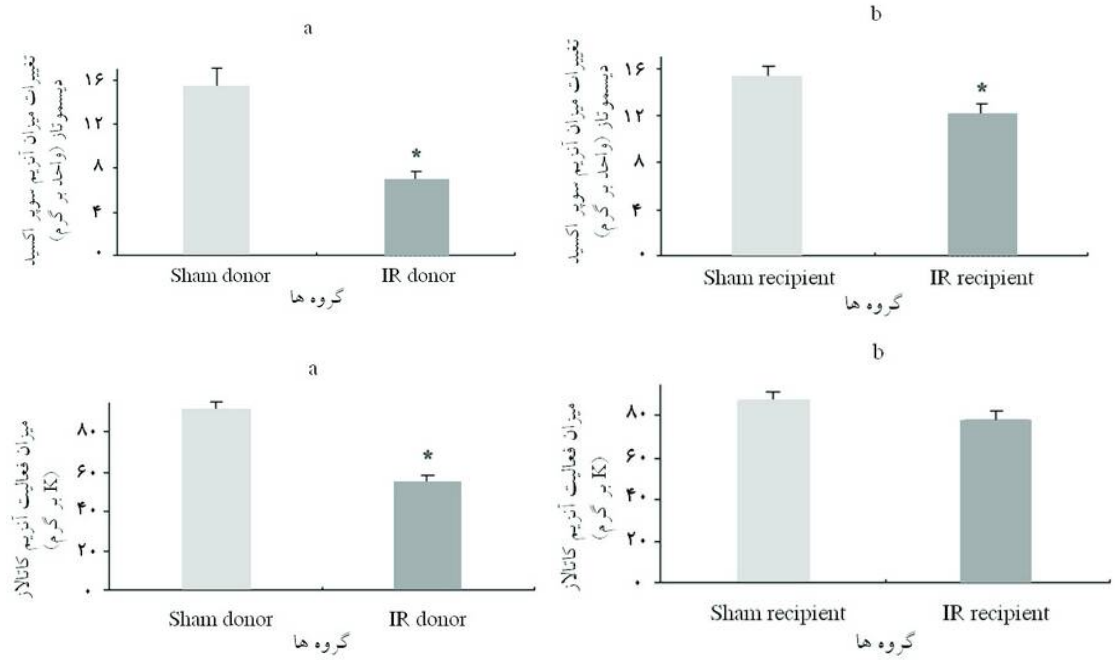


نمودار- ۲: تغییرات غلظت MDA کلیوی در گروه‌های مختلف. a) مقایسه IR donor و Sham donor، b) مقایسه IR recipient و Sham recipient. ستون‌ها نمایانگر میانگین± خطای معیار می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح P<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]



نمودار- ۳: تغییرات غلظت گلوتاتیون و FRAP کلیوی در گروه‌های مختلف. a) مقایسه IR donor و Sham donor. b) مقایسه IR recipient و Sham recipient. ستون‌ها نمایانگر میانگین± خطای معیار می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح P<۰/۰۵ نشان می‌دهد.



نمودار- ٤: تغییرات میزان آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز کلیوی در گروه‌های مختلف. a) مقایسه IR donor و Sham donor. b) مقایسه IR recipient و Sham recipient. ستون‌ها نمایانگر میانگین± خطای معیار می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح P<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]

IR donor به گروه IR recipient سبب کاهش میزان گلوتاتیون تام در این گروه گردید. میزان قدرت تام آنتی اکسیدانی (FRAP) در بافت کلیه گروه IR donor کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه Sham donor داشت (نمودار ۳a). به این ترتیب در این تحقیق کاهش میزان FRAP به عنوان ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت کلیه پس از القای نارسایی حاد کلیه ایسکمیک تلقی گردید. اگرچه انتقال لکوسیت‌های گروه IR donor به گروه IR recipient سبب کاهش میزان فعالیت FRAP در این گروه گردید، اما از نظر آماری این تفاوت در میزان FRAP بافت کلیه در گروه‌های IR recipient و Sham recipient معنی‌دار نبود (نمودار ۳b). میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در بافت کلیه گروه IR donor کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه Sham donor داشت (نمودار ۴a). به این ترتیب در این تحقیق کاهش میزان SOD به عنوان ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت کلیه پس از القای نارسایی حاد کلیه ایسکمیک تلقی گردید. هم‌چنین تفاوت معنی‌داری در میزان SOD بافت کلیه در گروه‌های IR recipient و Sham recipient دیده شد (نمودار ۴b). به این ترتیب انتقال لکوسیت‌های گروه IR donor به گروه IR recipient سبب کاهش میزان SOD در این گروه گردید. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (Catalase activity) در بافت کلیه گروه IR donor کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه Sham donor داشت (نمودار ۴a). به این ترتیب در این تحقیق کاهش میزان کاتالاز به عنوان ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت کلیه پس از القای نارسایی حاد کلیه ایسکمیک تلقی گردید. اگرچه انتقال لکوسیت‌های گروه IR donor به گروه IR recipient سبب کاهش میزان فعالیت کاتالاز در این گروه گردید، اما از نظر آماری این تفاوت در میزان کاتالاز بافت کلیه در گروه‌های IR recipient و Sham recipient معنی‌دار نبود (نمودار ۴b).

بررسی تغییرات بافت‌شناسی کلیه در گروه‌ها: بافت کلیه در گروه Sham donor ضایعه قابل ملاحظه‌ای را با میکروسکوپ نوری نشان نمی‌دهد (شکل ۱B). بافت‌ها در گروه IR donor در مقایسه با گروه Sham donor آسیب‌های بسیاری را نشان داد (شکل ۱A). در این گروه، با توجه به طولانی بودن زمان پرفیوژن مجدد (سه ساعت) بافت کلیه تغییرات قابل ملاحظه‌ای را نسبت به گروه Sham نشان داد. این تغییرات شامل انهدام گسترده توبول‌ها، نکروز نسبتا وسیع به‌خصوص در توبول‌های پروگزیمال، وجود انسداد توبولی قابل ملاحظه به‌ویژه در توبول‌های انتهایی‌تر، کم شدن ضخامت سلول‌ها و تحت فشار بودن سلول‌های اپیتلیال توبولی می‌باشد. در گروه Sham recipient، اگرچه مقداری از ضخامت سلول‌ها کم شده و تا حدی حاشیه‌های لومینال سلول‌ها کاهش نشان می‌دهند ولی انهدام سلول‌ها و آسیب غیر قابل برگشتی وجود ندارد (شکل ۱D). در گروه IR recipient، نسبت به گروه شم مربوطه واکوئوله شدن سلول‌ها و تشکیل مقادیری رسوب درون توبول‌ها به چشم می‌رسد اما توبول‌ها هنوز دست نخورده هستند و تغییر وسیع غیر قابل برگشتی از جمله نکروز کامل توبولی دیده نمی‌شود (شکل ۱C). در مجموع این گروه در آغاز گسترش آسیب بافتی است و اگرچه با گروه شم مربوطه بسیار متفاوت است ولی با گروه IR donor هم تفاوت بسیاری دارد.

بحث

تاکنون مطالعات زیادی درباره عوامل دخیل در ایجاد آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد در اندام‌های مختلف صورت گرفته است که برخی از آن‌ها مکانیسم‌های التهابی از قبیل انفیلتراسیون لکوسیت‌ها، القای سایتوکین‌ها و کموکین‌ها را به عنوان فاکتورهای موثر پیشنهاد نموده‌اند. از این‌رو بسیاری تحقیقات به بررسی نقش لکوسیت‌ها در ایجاد این آسیب پرداخته است.[۱۰-۱۲] اغلب این مطالعات، روی بررسی نقش لکوسیت‌ها در یک عضو متعاقب IR همان عضو صورت گرفته است که با توجه به حضور و دخالت سایر عوامل نتایج متفاوتی داشته است. به عنوان مثال مطالعات اخیر نشان داده‌اند که IR کلیوی موجب افزایش بیان TNF-α و افزایش ورود نوتروفیل‌ها به‌داخل بافت کلیه می‌شود.[۱۳و۱۴] در سال ۲۰۰۰، Mizutani با استفاده از پروتیین C فعال شده از فعال شدن لکوسیت‌ها جلوگیری کرده و در نتیجه از ایجاد آسیب بر اثر IR کلیوی جلوگیری نمود.[۴] وی هم‌چنین در سال ۲۰۰۳ در مطالعه دیگری گزارش نمود که آنتی‌ترومبین نیز با مهار فعال شدن لکوسیت‌ها IR کلیوی را کاهش می‌دهد.[۱۵] Rabb نیز در مطالعه خود بر روی موش‌های فاقد ژن لنفوسیت CD4/CD8 دریافت که این موش‌ها نسبت به موش‌های نرمال، در برابر IR کلیوی دچار آسیب کم‌تری می‌شوند.[۱۶] از سوی دیگر، Park مطرح نمود که ضایعات کلیوی متعاقب IR ارتباطی با ایمونوگلوبولین‌ها و یا لنفوسیت‌های T ندارد.[۱۷] هم‌چنین کاهش

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]

نوتروفیل‌ها در موش‌های فاقد ژن فعال‌کننده Recombinase نتوانست در مقابل آسیب‌های کلیوی محافظت نماید،[۱۸] بلکه انتقال سلول‌های B یا T به این موش‌ها توانست محافظت چشمگیری نشان دهد. هم‌چنین افزودن لکوسیت‌ها به محیط حاوی سلول‌های مغزی انسانی ضایعات سلولی را در یک مدل محرومیت از گلوکز و اکسیژن کاهش داد.[۱۹] سلول‌های B خارج پریتوان توانست احتمالا از طریق افزایش IL-10 آسیب‌های IR کلیوی را کم کند.[۲۰] لذا این مجموعه مطالعات نشان می‌دهد که مکانیسم‌های در برگیرنده نقش لکوسیت‌ها در آسیب IR بسیار پیچیده می‌باشند. یکی از عوامل آسیب رسان متعاقب IR کلیوی افزایش تولید متابولیت‌های فعال اکسیژن (ROS) توسط فاگوسیت‌ها می‌باشد. Demirbilek از یک آنتی‌اکسیدان به نام پلی‌ان‌فسفاتیدیل کولین (Polyenylphosphatidylcholine) جهت کاهش ضایعات ناشی از IR کلیوی استفاده کرده و دریافت که این آنتی‌اکسیدان اثر محافظتی در IR کلیوی دارد.[۲۱] هم‌چنین در سال‌های اخیر مطرح شده است که آسیب یک عضو می‌تواند توسط عوامل مختلف در اختلال اندام‌های دیگر نیز نقش داشته باشد. Hassoun در بررسی خود نشان داد که IR کلیوی موجب آسیب بافت ریه به عنوان یک عضو دوردست (Remote) می‌شود. IR کلیوی موجب افزایش نفوذپذیری ریوی گردید و در آزمایشات بافت‌شناسی نیز التهاب سلول‌های ریوی مشاهده شد.[۱] Liu التهاب و تغییرات عملکردی بافت مغز را نیز به‌دنبال IR کلیوی گزارش کرد.[۶] در سال ۲۰۰۹ نیز گزارش شده که به‌دنبال IR کلیوی غلظت کبدی TNF-α، اینترلوکین ۱۰، MDA افزایش و غلظت گلوتاتیون احیا شده کاهش یافته و مطالعات بافت‌شناسی نیز آسیب بافت کبدی را تایید کرده‌اند.[۸] جهت بررسی نقش اختصاصی لکوسیت‌ها، در یک مطالعه اخیر ما نقش انتقال لکوسیت‌ها را در القای آسیب کبدی به‌دنبال ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیوی در موش سوری Inbred بررسی نموده و نشان دادیم که لکوسیت‌های فعال شده در اثر IR کلیوی می‌توانند در کبد موش پذیرنده ایجاد ضایعات بافتی و استرس اکسیداتیو نموده و آنزیم‌های کبدی را نیز در خون افزایش دهند.[۱۵] این مطالعه به خوبی نشان داد که لکوسیت‌ها به تنهایی و بدون حضور سایر عوامل پلاسمایی و یا میانجی‌های عصبی انتقال یافته از دهنده می‌توانند در ایجاد ضایعات در کبد گیرنده نقش داشته باشند. در ادامه و در طرح حاضر بر آن شدیم تا نقش لکوسیت‌های فعال شده در اثر IR کلیه را در ایجاد آسیب در عضو مشابه یعنی کلیه‌های پذیرنده بررسی نماییم. ویژگی این تحقیق بررسی تغییرات کلیوی در کلیه‌ای است که خود مستقیما تحت القای IR قرار نگرفته است. بنابراین اثرات ناشی از IR عضو حذف شده و تنها اثر لکوسیت‌های فعال شده را بررسی می‌نماید. لذا تغییرات حاصل می‌تواند مطرح کننده تغییرات ایجاد شده در کلیه سالم موجود در بدن متعاقب IR کلیه دیگر هم باشد. موش‌ها در دو گروه Sham و IR کلیوی دوطرفه که ۶۰ دقیقه انسداد دو طرفه شریان کلیوی (ایسکمی) و به‌دنبال آن سه ساعت پرفیوژن مجدد را تحمل کردند، قرار گرفتند. پس از آن حیوانات بیهوش شده و نمونه خون و بافت کلیوی جمع‌آوری گردید. لکوسیت‌ها از خون جدا شده و به دو گروه پذیرنده منتقل شدند: موش‌های پذیرنده که لکوسیت‌های گروه شم را دریافت کردند (Sham recipient) و موش‌های پذیرنده که لکوسیت‌های گروه IR را دریافت نمودند (IR recipient). بعد از ۲۴ ساعت موش‌های پذیرنده بیهوش شدند و نمونه‌های خون و بافت کلیه جمع‌آوری شد. در گروه IR recipient نسبت به گروه Sham recipient میزان MDA بافت کلیه به‌طور معنی‌داری افزایش و گلوتاتیون تام و میزان فعالیت آنزیم SOD کلیوی به‌طور معنی‌داری کاهش یافتند. شاخص‌های عملکردی کلیوی شامل BUN و کراتینین پلاسما اگرچه در گروه IR دهنده با شم تفاوت معنی‌داری داشت ولی این پارامترها در دو گروه پذیرنده با یکدیگر تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. در بررسی‌های هیستولوژیک بافت کلیه در گروه IR donor در مقایسه با گروه Sham donor آسیب‌های بسیاری را شامل انهدام گسترده توبول‌ها، نکروز به نسبت وسیع به‌خصوص در توبول‌های پروگزیمال، وجود انسداد توبولی قابل ملاحظه به‌ویژه در توبول‌های انتهایی‌تر، کم شدن ضخامت سلول‌ها و تحت فشار بودن سلول‌های اپیتلیال توبولی نشان داد. در گروه IR recipient، نسبت به گروه شم مربوطه واکوئوله شدن سلول‌ها و تشکیل مقادیری رسوب درون توبول‌ها به چشم می‌رسد. در مجموع این گروه در آغاز گسترش آسیب بافتی است و اگرچه با گروه شم مربوطه بسیار متفاوت است ولی با گروه IR donor هم تفاوت بسیاری دارد. در مقاله مشابهی Burne-Taney نشان داد که انتقال لنفوسیت‌ها از موش دچار IR کلیوی می‌تواند در گیرنده سالم ایجاد ضایعه کلیوی و در نتیجه آلبومینوری نماید.[۲۲] هم‌چنین مقایسه آسیب‌پذیری کلیه با کبد گیرنده پس از انتقال لکوسیت‌ها در نتایج اخیر حاصل از این

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]

آزمایشگاه نشان می‌دهد که کلیه‌ها نسبتا اعضای مقاوم‌تری بوده و تزریق تعداد یکسان لکوسیت‌های فعال شده موجب آسیب‌های فراوان‌تری در کبد نسبت به کلیه‌ها می‌شود. چرا که کبد پذیرنده از نظر عملکردی و بافتی و استرس اکسیداتیو تغییرات بسیاری را نسبت به گروه شم گیرنده داشت.[۸] حال آن‌که در مطالعه حاضر، کلیه‌های پذیرنده علی‌رغم ایجاد استرس اکسیداتیو و آغاز تغییرات پاتولوژیک (بافت‌شناسی) از نظر عملکردی تفاوت چندانی با گروه شم نشان ندادند. این یافته‌ها لکوسیت‌ها را به عنوان یک عامل دخیل در آسیب بافتی و القای استرس اکسیداتیو در آسیب IR کلیه مطرح می‌نماید.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی آسیب کلیوی پذیرنده پس از انتقال لکوسیت‌ها از موش سوری Inbred مبتلا به ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیوی" مصوبه و با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۹ به کد ۱۰۹۹۱ می‌باشد.

References

1. Hassoun HT, Grigoryev DN, Lie ML, Liu M, Cheadle C, Tuder RM, et al. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(1):F30-40.
2. Lee HT, Kim M, Kim M, Kim N, Billings FT 4th, D'Agati VD, et al. Isoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury and modulates leukocyte infiltration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(3):F713-22.
3. Zhang ZX, Wang S, Huang X, Min WP, Sun H, Liu W, et al. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2008;181(11):7489-98.
4. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *Blood* 2000;95(12):3781-7.
5. Kanoria S, Jalan R, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. *Transplantation* 2007;84(4):445-58.
6. Liu M, Liang Y, Chigurupati S, Lathia JD, Pletnikov M, Sun Z, et al. Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(7):1360-70.
7. Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K, Akbulut G, Dilek ON. Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 2002;107(2):234-40.
8. Golab F, Kadkhodaee M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. *Kidney Int* 2009;75(8):783-92.
9. Chen WT, Huang WH, Wang D, Yu FC, Chi YC, Wu JC, et al. The protective effect of adenosine triphosphate-MgCl2 on ischemia-reperfusion lung injury is leukocyte dependent. *J Biomed Sci* 2003;10(6 Pt 2):725-30.
10. Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, Tian XH, Gronert K, Musto A, et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003;278(44):43807-17.
11. Harada N, Okajima K, Murakami K, Usune S, Sato C, Ohshima K, et al. Adenosine and selective A(2A) receptor agonists reduce ischemia/reperfusion injury of rat liver mainly by inhibiting leukocyte activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294(3):1034-42.
12. Khastar H, Kadkhodaee M, Sadeghipour HR, Seifi B, Hadjati J, Delavari F, et al. Leukocyte involvement in renal reperfusion-induced liver damage. *Ren Fail* 2011;33(1):79-83.
13. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 2):R922-9.
14. Meldrum KK, Meldrum DR, Meng X, Ao L, Harken AH. TNF-alpha-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282(2):H540-6.
15. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Isobe H, Harada N, Mizutani S, et al. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation through promotion of prostacyclin production. *Blood* 2003;101(8):3029-36.
16. 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(3):F525-31.
17. Park P, Haas M, Cunningham PN, Bao L, Alexander JJ, Quigg RJ. Injury in renal ischemia-reperfusion is independent from immunoglobulins and T lymphocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282(2):F352-7.
18. Burne-Taney MJ, Yokota-Ikeda N, Rabb H. Effects of combined T- and B-cell deficiency on murine ischemia reperfusion injury. *Am J Transplant* 2005;5(6):1186-93.
19. Cowan KM, Easton AS. Neutrophils block permeability increases induced by oxygen glucose deprivation in a culture model of the human blood-brain barrier. *Brain Res* 2010;1332:20-31.
20. Renner B, Strassheim D, Amura CR, Kulik L, Ljubanovic D, Glogowska MJ, et al. B cell subsets contribute to renal injury and renal protection after ischemia/reperfusion. *J Immunol* 2010;185(7):4393-400.
21. Demirbilek S, Karaman A, Baykarabulut A, Akin M, Gürünlüoglu K, Türkmen E, et al. Polyenylphosphatidylcholine pretreatment ameliorates ischemic acute renal injury in rats. *Int J Urol* 2006;13(6):747-53.
22. Burne-Taney MJ, Liu M, Ascon D, Molls RR, Racusen L, Rabb H. Transfer of lymphocytes from mice with renal ischemia can induce albuminuria in naive mice: a possible mechanism linking early injury and progressive renal disease? *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291(5):F981-6.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]

Tehran University Medical Journal; Vol. 70, No. 2, May 2012: 69-77

Recipient kidney damage after leukocyte transfer from inbred mice with renal ischemia-reperfusion injury

Mehri Kadkhodaee Ph.D.[1*]
Hossein Khastar Ph.D.[2]
Behjat Seifi Ph.D.[1]
Atefeh Najafi M.Sc.[3]
Fatemeh Delavari M.Sc.[1]

1- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
3- Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: September 07, 2011 Accepted: January 23, 2012

Abstract

***Background*:** In a recent study, we were able to demonstrate a role for leukocyte transfer in the induction of liver damage in recipient mice after induction of IR (60 min of bilateral renal artery occlusion and 3 hrs reperfusion) injury in donors. The present study investigates the role of leukocyte transfer in the induction of kidney damage in recipient mice after induction of renal IR injury in donors.

***Methods*:** Mice were divided into two sham and renal IR groups. After anesthesia, leukocytes were isolated from blood and were transferred to the two recipient groups: the intact recipient mice received leukocytes from the sham donor group (Sham recipient) and the intact recipient mice that received leukocytes from IR donor group (IR recipient). After 24 hrs, the recipient mice were anesthetized and blood samples and renal tissues were collected.

Results: Renal malondialdehyde (MDA) increased and glutathione and superoxide dismutase (SOD) decreased significantly in IR recipient group in comparison to sham recipient group. Although renal function tests, including BUN and plasma creatinine were significantly different between IR donor and sham donor groups, but they were not significantly different in two recipient groups. Renal tissues in IR donor group showed extensive damage compared to sham group, but in IR recipients' kidneys, they were different from IR donor tissues despite being different from their respective sham group.

Conclusion: These findings are suggestive of implication of leukocytes in renal tissue damage and oxidative stress after renal IR injury.

Keywords: Ischemia-reperfusion injury, kidneys, leukocytes, oxidative stress.

[*] Corresponding author: Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences University, Poursina St., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 64053288
E-mail: kadkhodm@tums.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-11]