

بررسی استریولوژیک حجم ساختارهای کلیه در پانکراتیت القا شده توسط ال- آرژینین و نقش درمانی پانکراتین

رحمت‌اله فتاحیان دهکردی^{۱*}، محمدجواد یزدان‌پناه^۲، رضا ختوان^۲

۱. دانشیار علوم تشریحی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸

زمینه و هدف: هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی استریولوژیک تأثیر حفاظتی پانکراتین بر تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در ساختارهای کلیوی موش به‌دنبال تیمار با ال- آرژینین بود.
مواد و روش‌ها: برای انجام تحقیق، ۵۰ موش سوری نر بالغ با وزن 30 ± 2 گرم به ۵ گروه (مساوی) دسته‌بندی شدند. در گروه کنترل، هیچ‌گونه تجویزی صورت نگرفت. گروه‌های القای پانکراتیت، ۲ دوز ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن بدن ال- آرژینین دریافت کردند. به گروه‌های القای پانکراتیت با ۲ دوز متفاوت، داروی درمانی ۳/۵ واحد لیپاز- پانکراتین تجویز گردید. تمام تیمارها به‌مدت ۳ روز متوالی یکبار در روز، محلول ال- آرژینین دریافت کرده و ۷۲ ساعت بعد، محلول لیپاز- پانکراتین به مدت ۲۰ روز به گروه‌های پانکراتیت تجویز گردید.
یافته‌ها: نتایج نشان داد که به‌دنبال پانکراتیت تجربی، به‌استثنای حجم بخش مرکزی، کاهش حجم قشر کلیه، حجم لوله‌های پیچیده نزدیک و دور و نیز گلومرول‌ها در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل دیده شد. با تجویز لیپاز- پانکراتین همراه با ال- آرژینین، مقادیر میانگین حجم فاکتورهای بخش قشری، لوله‌های پیچیده نزدیک و گلومرول‌ها به گروه کنترل نزدیک شده بود.
نتیجه‌گیری: براساس بررسی نهایی یافته‌ها، محلول لیپاز- پانکراتین می‌تواند تا حدی در کاهش تأثیرات پانکراتیت القا شده توسط دوز بالای ال- آرژینین مؤثر باشد.

کلیدواژه‌ها:

استریولوژی، ال- آرژینین، پانکراتیت، لوله‌های پیچیده، موش.

۱. مقدمه

پانکراتیت مزمن، سندرمی است که با آماس پانکراس، فیبروزه شدن آن و از دست رفتن سلول‌های آسینی و سلول‌های جزایر لانگرهانس مشخص می‌شود. عوامل مختلفی باعث بروز پانکراتیت مزمن می‌شود؛ از جمله مصرف الکل، دخانیات، ژنتیک، بیماری‌های خودایمن، انسدادها و پانکراتیت حاد شدید عودکننده (۱). معمولاً پانکراتیت در مدل‌های حیوانی (موش) با روش‌های مختلفی

القا می‌شود؛ از جمله سرولین^۱ (۲)، انفوزیون داخل مجرای سدیم تاروکولات^۲، انسداد مجرای پانکراس و القا توسط آرژینین (۳، ۴). ال- آرژینین یک اسیدآمیننه ضروری است که پیش‌ساز ساخت پروتئین‌ها، اوره، پلی‌آمین‌ها، پرولین، گلوتامات، کراتین، آگماتین و نیترو اکسید است (۵). بر پایه برخی مطالعات، ال- آرژینین سبب القای پانکراتیت حاد نکروزشونده می‌شود (۶). تحقیقات نشان دادند که Mizunuma به‌عنوان اولین

2. Taurocholate

1. Caerulei

* نویسنده مسئول: رحمت‌الله فتاحیان دهکردی

نشانی: بخش علوم آناتومی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه دولتی شهرکرد، شهرکرد، ایران

تلفن: ۰۳۸-۳۲۳۲۴۴۲۷

رایانامه: fatahian_1349@yahoo.com

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0003-2126-6847

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۸، شماره ۱، خرداد و تیر ۱۴۰۰، ص ۲۵۰-۲۵۸

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۹). در واقع SAP سبب بروز یک آماس عمومی و تجمع مایع آگزودا در محوطه‌ی شکمی و محوطه‌ی پشت صفاقی شده که نتیجه آن، IAH و کاهش خون‌رسانی و در نتیجه آتروفی کلیه است (۱۸). گزارش شده است که IAH باعث کاهش خون‌رسانی به قشر کلیه و در نتیجه کاهش حجم آن می‌شود (۲۰). از اولین نشانه‌های IAH، کاهش ادرار و اختلال کلیوی است که تأییدکننده مطالعات مذکور است (۲۱، ۲۲). مطالعه دیگری نشان داد که در جریان خون مبتلایان به SAP، مواد القاکننده آپوپتوز وجود دارد که باعث آسیب به سلول‌های پوششی لوله‌های کلیوی و کاهش متعاقب حجم آن‌ها می‌شود (۲۳). مشخص شده است که پانکراتین^۱ در بهبود برخی آسیب‌های وارد شده به پانکراس در اثر پانکراتیت مزمن مؤثر است و هر چند که دارویی با قیمت نسبتاً بالایی است ولی به‌خوبی از سوی بیماران تحت درمان تحمل می‌شود (۲۴، ۲۵). لذا مطالعه حاضر به بررسی استریولوژی کلیه موش‌های مبتلا به پانکراتیت مزمن القا شده توسط ال-آرژنین پرداخته و تأثیر محافظتی پانکراتین ارزیابی شده است. استریولوژی، شاخه‌ای از علم مورفولوژی است که با به‌کارگیری قواعد ریاضی از مقاطع میکروسکوپی دو بعدی، اطلاعاتی سه بعدی ارائه می‌دهد. یکی از مزایای استریولوژی کم کردن مقدار نمونه‌گیری و در عین حال قابل‌اطمینان بودن نتایج حاصل در مورد کل ساختار موردبررسی می‌باشد (۲۶).

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. حیوانات

تمام پروتکل آزمایش در پژوهش حاضر، با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در آزمایشگاه هیستو-پاتولوژی دانشگاه شهرکرد انجام شد. ۵۰ عدد موش سوری نر بالغ با میانگین وزنی 30 ± 2 گرم فراهم گردید و به‌منظور سازگاری با محیط، دو هفته سازگاری، موش‌ها در ۵ گروه ۱۰ تایی دسته‌بندی شدند. برای القای پانکراتیت از محلول ۸ درصد ال-آرژنین با $PH=7$ و جهت گروه تیمار درمان از پانکراتین حاوی $3/5$ واحد محلول لیپاز-پانکراتین ۱ درصد (۱) استفاده گردید. مطالعه حاضر با کد اخلاق IR.SKU.REC.1398.14178 در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد تأیید شده است و کلیه روش‌های

فرد آزمایش‌کننده، مشخص کرد یک تزریق داخل صفاقی ال-آرژنین با دوز 500 میلی‌گرم/۱۰۰ گرم وزن بدن در موش‌های صحرایی، سبب آسیب به سلول‌های آسینی پانکراس بدون ایجاد تغییرات مورفولوژیک در جزایر لانگرهانس می‌شود (۷). Tashiro و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که ال-آرژنین باعث تغییر در رشته‌های اکتین اسکلت سلولی و افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی در سلول‌های آسینی پانکراس می‌شود. در مطالعه آن‌ها مشاهده شد ۱۲ ساعت بعد از پانکراتیت القا شده توسط ال-آرژنین با غلظت $4/5$ گرم/کیلوگرم، آماس بینابینی، نفوذ ملایم سلولی و تشکیل واکوئل در سلول‌های آسینی پانکراس رخ داده و بعد از ۲۴ ساعت نکرور سلول‌های آسینی با درگیری کل لوبول‌های پانکراس و از بین رفتن ساختار آسینی‌ها قابل مشاهده است. چنانچه به فاصله پس از ۷۲ ساعت آسینی‌های باقی‌مانده، مجموعه‌هایی از لوله‌های احاطه شده توسط فیبروبلاست‌ها و سلول‌های التهابی هستند. Tashiro و همکاران (۲۰۰۱) همچنین مشاهده کردند که در اثر تزریق ال-آرژنین با غلظت کمتر (3 گرم/کیلوگرم) بعد از ۲۴ ساعت، آسیب پانکراس با شدت کمتر به همراه آماس بسیار ملایم‌تری ایجاد می‌شود و بعد از ۷۲ ساعت، بیشتر سلول‌های آسینی پانکراس سالم باقی می‌مانند و فقط کانون‌های کوچکی از آماس و فیبروز در پارانشیم پانکراس مشاهده می‌شود (۸).

به‌دنبال پانکراتیت علاوه بر پانکراس، نارسایی در چند اندام دیگر از جمله کلیه نیز دیده می‌شود (۹). براساس تحقیقات انجام شده، یکی از شایع‌ترین مشکلات پانکراتیت حاد شدید (SAP)، نارسایی حاد کلیوی است، به‌طوری که در ۱۴ الی ۴۲ درصد افراد مبتلا به SAP نارسایی کلیوی هم دیده می‌شود (۱۰-۱۴). پانکراتیت حاد، سبب آزادسازی آمیلاز از پانکراس آسیب‌دیده می‌گردد و در نتیجه، کاهش خون‌رسانی کلیوی را به همراه داشت که در نهایت منجر به آسیب کلیوی می‌شود (۱۵). به‌دنبال پانکراتیت، تجمع سریع مقدار زیادی از فسفولیپاز A₂ پانکراس، سبب آسیب‌رسانی به لوله‌های پیچیده نزدیک کلیه می‌گردد (۱۶). از مشکلات دیگر ناشی از SAP، سندرم حفره شکمی (ACS) است (۱۷). افزایش فشار داخل شکمی (IAH) ناشی از ASC، سبب کاهش خون‌رسانی به اندام‌های شکمی از جمله ساختار کلیه شده (۱۸) و با آزاد شدن سایتوکین‌ها به جریان خون عمومی، اندام‌های شکمی از جمله کلیه را

تعویض گردید. پس از انجام مراحل آماده کردن بافت و شفاف‌سازی، با استفاده از میکروتوم دوار مقاطعی با ضخامت ۵ میکرومتر به صورت تصادفی تهیه و با رنگ همتوکسیلین-آئوزین رنگ‌آمیزی شدند. برای بررسی تغییرات بافتی حاصل از میکروسکوپ نوری مدل Olympus استفاده گردید. بعدسنجی اسلایدهای بافتی با تکنیک استریولوژی مشخص گردید.

۵.۲. محاسبه حجم ساختارهای مورد نظر به روش استریولوژی

ابتدا از هر بلاک پارافینه شده کلیه به صورت تصادفی، ۵ عدد مقطع مناسب با ضخامت ۵ میکرومتر توسط میکروتوم تهیه شد. در مجموع ۲۰ اسلاید تهیه و با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به یک صفحه نمایش و با استفاده از یک شبکه (Grid) مناسب بررسی شدند. شبکه دارای ۴۲ نقطه با فاصله ۱۲ میلی متری از هم بود. روش کار که براساس اصول کوالیری انجام گرفت بدین صورت بود که با میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰× به صورت کاملاً تصادفی، ۳ بخش از هر اسلاید کلیه انتخاب می‌شد و با قرار دادن شبکه روی صفحه نمایش متصل به میکروسکوپ نوری، تعداد نقاطی که ساختار مورد نظر را در برمی گرفتند، شمارش شد و در انتها با استفاده از فرمول زیر حجم هر ساختار محاسبه شد (۲۶-۲۸).

$$V = t \times a(p) \times \Sigma P / M^2$$

در این فرمول، V حجم ساختار مورد بررسی برحسب میلی متر مکعب، t ضخامت برش برحسب میکرومتر، a(p) مساحت اطراف هر نقطه از شبکه برحسب میلی متر مربع، ΣP مجموع نقاط برخوردکننده به ساختار مورد و M بزرگ‌نمایی میکروسکوپ نوری است (تصویر ۲).

۶.۲. تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS v.23 و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (Oneway ANOVA) و تست آماری LSD تجزیه و تحلیل آماری شدند. تفاوت میانگین‌ها در سطح ($p < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳. یافته‌ها

نتایج به دست آمده از مطالعه هیستومورفومتری و استریولوژی ساختار بافتی کلیه در تصاویر (۱) و (۲) و جدول (۱) نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز آماری میانگین حجم ناحیه قشری در بررسی

به کارگرفته شده در پژوهش حاضر از جمله آسان‌کشی، با رعایت کامل اصول اخلاقی مقید کردن حیوان انجام پذیرفت.

۲.۲. نحوه نگهداری

دو هفته پیش از شروع آزمایش، موش‌ها در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و با برنامه‌ی نوری ۱۲ ساعته روشنایی- تاریکی و دسترسی کامل به آب و غذا نگهداری شدند. تغذیه موش‌ها، پلیت‌های آماده حاوی ویتامین‌های ضروری برای بدن بود. محیط نگهداری قفس‌های مخصوص با کف پوشیده شده از خاک اره تازه همراه با تعویض دو روز یک بار بستر به منظور حفظ بهداشت قفس‌ها در نظر گرفته شد.

۳.۲. گروه‌بندی

گروه ۱: به عنوان گروه کنترل شاهد در نظر گرفته شد و بدون هیچ درمانی در طول دوره، دست‌نخورده باقی ماندند. گروه ۲: گروهی که با تجویز محلول ال-آرژینین با دوز $300 \text{ mg}/100 \text{ g}$ پانکراتیت القا گردید.

گروه ۳: گروهی که محلول ال-آرژینین با دوز $100 \text{ mg}/100 \text{ g}$ تجویز شد و از محلول لیپاز-پانکراتین (۳/۵ واحد) برای درمان استفاده شد.

گروه ۴: گروهی که با تجویز محلول ال-آرژینین با دوز $400 \text{ mg}/100 \text{ g}$ پانکراتیت القا گردید.

گروه ۵: گروهی که محلول ال-آرژینین با دوز $100 \text{ mg}/100 \text{ g}$ تجویز شد و از محلول لیپاز-پانکراتین (۳/۵ واحد) برای درمان استفاده شد.

محلول‌های نرمال سالین به عنوان دارونما و ال-آرژینین به منظور القای پانکراتیت، تنها یک بار در ابتدای دوره تیمار تجویز شد و به مدت ۳ روز تحت مراقبت قرار گرفتند. محلول لیپاز-پانکراتین (پانکراتین) در ۳/۵ واحد لیپاز به منظور پیشگیری و درمان پانکراتیت ایجاد شده، به مدت ۱۴ روز روزانه دو بار تجویز شد. تجویز محلول‌های نرمال سالین و لیپاز-پانکراتین با روش گاواژ و محلول ال-آرژینین با روش تزریق درون صفاقی (IP) انجام شد.

۴.۲. نمونه‌گیری

در پایان آزمایش، موش‌ها توسط دی اتیل اتر در دسیکاتور به روش انسانی (مرگ آسان) کشته شدند. سپس ساختار کلیه در تمام موش‌ها با تشریح خارج گردید. نمونه‌ها درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت برای افزایش نفوذ فرمالین به درون مقاطع بافتی، فرمالین

این تغییر به صورت کاهش معنی داری در این دو گروه تیمار نسبت به گروه کنترل بود ($p < 0/05$). مقایسه میانگین بین گروهی حجم لوله‌های پیچیده نزدیک مشخص کننده افزایش حجم در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ و کاهش این فاکتور در گروه ۵ نسبت به گروه ۴ بود؛ هر چند که از لحاظ آماری معنی دار نبودند ($p > 0/05$).

بر پایه نتایج حاصل از تحلیل یافته‌ها، میانگین مربوط به حجم لوله‌های پیچیده دور در گروه کنترل از بالاترین مقدار $0/46 \pm 0/042$ در این گروه به پایین ترین حد خود در گروه ۵ با مقدار $0/22 \pm 0/013$ کاهش یافته بود ($p < 0/05$). از سوی دیگر کاهش آماری معنی داری بین گروه‌های دریافت کننده ال- آرژنین همراه با لیپاز- پانکراتین (گروه‌های ۳ و ۵) در حجم لوله‌های پیچیده دور نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($p < 0/05$). مقایسه میانگین حجم لوله‌های پیچیده دور هیچ گونه اختلاف معنی داری بین گروه ۳ نسبت به ۲ و گروه ۵ نسبت به ۴ نشان نداد ($p < 0/05$).

از بررسی آنالیز آماری حجم گلومرول‌های کلیوی چنین دریافت شد که به استثنای گروه ۲، تغییرات معنی داری بین گروه کنترل و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ وجود ندارد ($p > 0/05$). در گروه ۲، کاهش معنی داری در حجم گلومرول‌های کلیوی نسبت به گروه کنترل آشکارا مشاهده گردید ($p < 0/05$). نیز مقایسه میانگین بین گروهی حاکی از افزایش معنی دار حجم گلومرول‌ها در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ بود ($p > 0/05$).

جدول ۱: مقایسه میانگین حجم قشر، مدولا، لوله‌های خمیده نزدیک، لوله‌های خمیده دور و گلومرول‌ها بر حسب میلی متر مکعب (mm^3) در گروه‌های مختلف از موش‌های نر بالغ بعد از ۲ هفته تیمار.

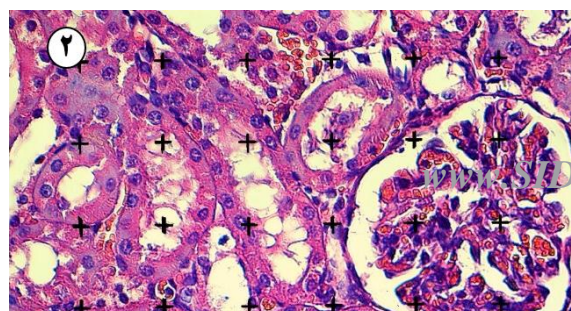
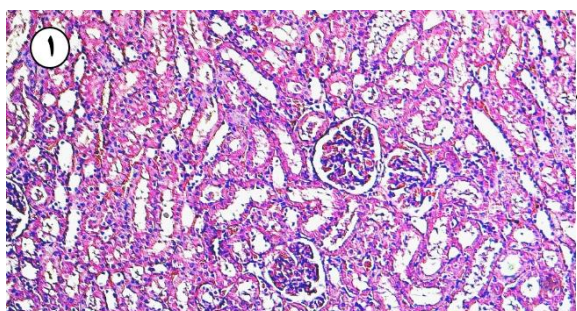
گروه‌ها	حجم قشر (mm^3)	حجم مدولا (mm^3)	حجم لوله‌های خمیده نزدیک (mm^3)	حجم لوله‌های خمیده دور (mm^3)	حجم گلومرول‌ها (mm^3)
گروه ۱ (کنترل)	$51/52 \pm 13/99$	$60/08 \pm 9/03$	$1/09 \pm 0/2$	$0/46 \pm 0/042$	$0/05 \pm 0/005$
گروه ۲ (ال-آرژنین)	$38/69 \pm 12/1$	$65/05 \pm 12/1$	$1/01 \pm 0/21$	$0/40 \pm 0/029$	$0/02 \pm 0/001$
گروه ۳ (ال-آرژنین + پانکراتین)	$47/06 \pm 6/69$	$56/69 \pm 6/69$	$1/07 \pm 0/35$	$0/36 \pm 0/013$	$0/05 \pm 0/007$
گروه ۴ (ال-آرژنین)	$33/66 \pm 9/03$	$61/03 \pm 8/64$	$0/75 \pm 0/09$	$0/42 \pm 0/028$	$0/04 \pm 0/004$
گروه ۵ (ال-آرژنین + پانکراتین)	$43/71 \pm 8/64$	$42/22 \pm 13/99$	$0/68 \pm 0/11$	$0/22 \pm 0/013$	$0/05 \pm 0/005$

مقادیر به صورت $means \pm SD$ می باشد (انحراف معیار \pm میانگین).

ساختار بافتی کلیه مشخص گردید که حجم قشر در دو گروه دریافت کننده ال- آرژنین با دوزهای ۳۰۰ و $400mg/100g$ (گروه‌های ۲ و ۴) نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی داری بودند ($p < 0/05$). مقایسه میانگین بین گروهی نشان داد که میانگین حجم قشر در گروه ۳ (ال- آرژنین $300mg/100g$ + لیپاز-پانکراتین) نسبت به گروه ۲ و در گروه ۵ (ال- آرژنین $400mg/100g$ + لیپاز-پانکراتین) نسبت به گروه ۴ از افزایش قابل ملاحظه‌ای برخوردار هستند؛ اگرچه این افزایش از لحاظ آماری معنی دار نبود ($p > 0/05$).

با رهیافت ارزیابی استریولوژیکی حجم بخش مرکزی کلیه در گروه‌های مورد مطالعه، داده‌های آماری حاکی از تغییرات مشخصی بین تمامی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل بود. همچنان که میانگین حجم بخش مرکزی از مقدار $60/08 \pm 9/03$ در گروه کنترل به مقادیر $51/52 \pm 13/99$ و $61/03 \pm 8/64$ به ترتیب در گروه‌های ۲ و ۴ افزایش یافت؛ با این حال روند افزایشی معنی دار نبود ($p > 0/05$). مقایسه میانگین حجم بخش مرکزی کلیه در بین گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که حجم بخش مرکزی کلیه در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ و نیز در گروه ۵ نسبت به گروه ۴ از روند کاهشی تبعیت می کند ($p > 0/05$).

داده‌های حاصل از بررسی استریولوژیکی و اندازه‌های حجمی لوله‌های پیچیده نزدیک در جدول، نشان دهنده تغییرات معنی داری بین گروه‌های ۲ و ۴ تیمار نسبت به گروه کنترل بود. با بررسی این داده‌ها مشخص گردید که



تصویر ۱ و ۲. نمای میکروسکوپی از ساختار بافتی کلیه به ساختارهای گلمرولی، لوله‌های پیچیده نزدیک و لوله‌های پیچیده دور توجه شود: (رنگ آمیزی H&E، بزرگ‌نمایی به ترتیب ۲۰۰× و ۴۰۰×). برای برآورد حجم ساختارهای متفاوت موجود در ناحیه قشر بافت کلیه، شبکه (گرید) نقطه چین روی تصویر میکروسکوپی کلیه قرار گرفت. محورهای x و y به‌عنوان فاصله بین دو نقطه در نظر گرفته شد و جهت محاسبه a(p) مورد استفاده قرار گرفت.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

داد و استفاده هم‌زمان آن در گروهی که دوز ۴۰۰ mg ال-آرژینین (گروه ۵) دریافت کرده بود، تأثیرات بهبودی مشاهده نگردید. به‌دنبال پانکراتیت، فسفولیپاز A₂ از پانکراس آزاد شد و در لوله‌های پیچیده کلیه تجمع پیدا می‌کند که سبب بروز تغییرات مشخصی در ساختار بافتی لوله‌های پیچیده می‌شود (۳۱). فسفولیپاز A₂ با فعال کردن مسیر لیپو-اکسیژناز و در نتیجه کاهش فشار خون کلیه و کاهش اکسیژن رسانی به لوله‌های پیچیده، تأثیر مخرب خود را بر ساختار بافتی این لوله‌ها نشان می‌دهد (۳۲). در بین گروه‌های تیمار افزایش حجم لوله‌های پیچیده نزدیک در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ نشان‌دهنده تأثیرات بهبودی لیپاز-پانکراتین بر پانکراتیت ایجاد شده با دوز ۳۰۰ mg ال-آرژینین است تا جایی که میانگین حجم لوله‌ها به مقادیر کنترل نزدیک شده بود. در گروه لیپاز-پانکراتین همراه با دوز ۴۰۰ mg ال-آرژینین (گروه ۵) این تأثیرات بهینه بر حجم ساختار دیده نشد.

همچنان که مشاهده گردید، حجم لوله‌های پیچیده دور در دو گروه ۳ و ۵ نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود؛ به طوری که میانگین حجم لوله‌ها نسبت به گروه‌های ۲ و ۴ از حد معمول پایین‌تر بود که نشان‌دهنده ناکارایی لیپاز-پانکراتین در گروه‌های ۳ و ۵ در مقابل دوزهای متفاوت ال-آرژینین (۳۰۰ و ۴۰۰ mg) در گروه‌های ۲ و ۴ بود. بیشترین شدت تغییر در لوله‌های پیچیده دور در گروه ۵ مشاهده گردید که نشان‌دهنده عدم تأثیرگذاری دوز استفاده شده لیپاز-پانکراتین در بهبود تغییرات ایجاد شده در لوله‌های پیچیده دور در گروه ۵ است. به بیان دیگر، در گروه ۵ چنین به نظر می‌رسد که لیپاز-پانکراتین همراه با

هرچند که رشد طبیعی و چندین فرایند فیزیولوژیکی مهم در بدن نیازمند مصرف آمینواسیدهای مختلف از جمله اسیدآمینه ال-آرژینین است؛ مصرف دوز بیش از حد متعارف آن می‌تواند عوارضی از جمله پانکراتیت را به همراه داشته باشد؛ همچنان که Dawra و همکاران (۲۰۰۷) در طرح تحقیقاتی خود در دو مرحله تزریق داخل صفاقی با استفاده از تجویز دوز نسبتاً بالای ال-آرژینین به موش‌های گروه تیمار، پانکراتیت حاد ایجاد کردند (۲۹). در تحقیقی دیگر مشخص گردید که سطح سرمی ال-آرژینین با تجویز روزانه ۵ گرم از آن در رژیم غذایی، تغییرات چشم‌گیری در اغلب بافت‌ها ایجاد نمی‌کند ولی تا حد زیادی می‌تواند سبب تغییرات ساختاری بافت کلیه گردد. در مطالعه‌ای که Raff و همکاران (۲۰۰۵) بر موش‌های ماده نژاد Sprague-Dawley انجام دادند مشخص گردید که دوز بسیار پایین آرژینین (۰/۱۲ گرم) در آسیب‌های کلیوی، نه تنها سبب تغییر مورفولوژی کلیه نمی‌شود بلکه می‌تواند روند بهبود مورفولوژی و حیات سلولی را به دنبال داشته باشد (۳۰). در مطالعه حاضر بعد از گذشت مدت زمان آزمایش (۲ هفته) در تمام موش‌هایی که دو دوز متفاوت از ال-آرژینین دریافت کرده بودند (گروه‌های ۲ و ۴)، حجم لوله‌های پیچیده نزدیک نسبت به گروه کنترل کاهش قابل توجهی را نشان دادند. به این صورت که کمترین حجم لوله‌ها در گروه ۴ مشاهده گردید. استفاده از لیپاز-پانکراتین همراه با ال-آرژینین تنها در گروهی که از دوز ۳۰۰ mg ال-آرژینین (گروه ۳) استفاده شده بود، تأثیرات بهبودی از خود نشان

صورت کاهش قابل مشاهده بود؛ بنابراین می‌تواند نشان‌دهنده تغییرات سلولی به دنبال تجویز ال-آرژینین با دوزهای ۳۰۰ mg و ۴۰۰ mg در این دو گروه باشد. ثابت شده است که ۴۸ ساعت پس از پانکراتیت، مقدار آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز، مس و روی در کلیه کاهش می‌یابد (۳۷). از طرفی به علت نزدیکی پانکراس و کلیه از نظر آناتومیکی، متابولیت‌های سلول‌های التهابی به خصوص رادیکال‌های آزاد اکسیژن در پانکراس ملتهب بر کلیه هم آثار تخریبی دارند (۳۸) و با وجود کاهش آنتی‌اکسیدان‌های محافظت‌کننده کلیه در برابر این متابولیت‌ها آسیب و آتروفی در قشر کلیه، شدیدتر خواهد بود. در پانکراتیت با افزایش خاصیت چسبندگی^۱ خون ناشی از کاهش تخریب گلبول‌های قرمز، مقدار خون ورودی به کلیه کاهش می‌یابد (۱۳). از طرفی، به علت هیپرلیپیدمی ناشی از پانکراتیت، تجمع لیپید در عروق خون‌رسان به کلیه افزایش می‌یابد (۲۷). با توجه به این دو پاسخ فیزیولوژیک و نیز اینکه بیشتر جریان خون کلیوی توسط قشر کلیه دریافت می‌شود، قشر کلیه دست‌خوش اختلال خون‌رسانی بارزتر و در نتیجه متحمل آتروفی شدیدتری نسبت به مدولای کلیه می‌شود. البته مشاهدات مطالعه حاضر بیانگر آن بود که مصرف لیپاز-پانکراتین همراه با دو دوز متفاوت ال-آرژینین در گروه‌های ۳ و ۵ سبب نزدیک شدن میانگین حجم قشر کلیوی به گروه کنترل شده است.

براساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، تجویز ال-آرژینین با دو دوز متفاوت در گروه‌های ۲ و ۴ سبب ایجاد افزایش در میانگین حجم بخش مرکزی در این گروه‌ها نسبت به گروه کنترل گردید. به نظر می‌رسد که این افزایش حجم در ارتباط با تغییرات سلولی لوله‌های جمع‌کننده ادرار در بخش مرکزی باشد. در گروه‌های ۳ و ۵ کاهش حجم بخش مرکزی کلیه نشانگر بهبود شرایط موجود در مقایسه با گروه‌های ۲ و ۴ می‌باشد تا حدی که افزایش حجم ناشی از تجویز ال-آرژینین تعدیل شد. در پانکراتیت حاد با افزایش ویسکوزیته خون و کاهش متعاقب جریان خون به درون ساختار گلوبول و پس از آن به داخل مدولا باعث اختلال در ریزجریان موجود در لوله‌های کلیوی در بخش مرکزی شده و تغییرات بافتی مذکور رخ می‌دهند (۳۸). همچنین پانکراتیت باعث افزایش مقاومت رگ‌ها در اطراف لوله‌های کلیوی در بخش‌های قشری و مرکزی شده که بافت مذکور تحت تأثیر متعاقب آن قرار می‌گیرد (۱۳).

دوز ۴۰۰ mg ال-آرژینین تأثیرات بهبوددهنده را از خود نشان نمی‌دهد؛ به طوری که میانگین حجم لوله‌های پیچیده دور گروه ۵ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری یافته بود که با توجه به کاهش حجم خون در اثر پانکراتیت و به دنبال آن ایجاد هیپوکسی در لوله‌های کلیوی، این کاهش حجم در لوله‌های پیچیده دور در گروه ۵ قابل توجه است (۳۲). از طرفی ثابت شده است که فسفولیپاز A₂ آزاد شده از پانکراس ملتهب، باعث تجزیه لسیتین و فسفولیپیدهای موجود در غشای سلول‌های پوششی لوله‌های پیچیده دور می‌شود. این فرایند، منجر به تولید متابولیت‌های غیرطبیعی از جمله لسیتین همولیتیک، اسیدهای چرب آزاد، آسیل کارنیتین، آسیل کوآنزیم و لیزوفسفاتیدها می‌شود که باعث آسیب و آتروفی لوله‌های پیچیده دور می‌شوند. اسیدهای چرب آزاد با مسدود کردن پمپ سدیم-پتاسیم و مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو و در نتیجه اختلال در تنفس سلولی، در اپیتلیوم لوله‌های پیچیده دور، اثر مخرب خود را بروز می‌دهند (۳۳).

در این مطالعه، بررسی فاکتور حجم گلوبولی بیانگر روند کاهش در گروه تجویز ال-آرژینین با دوزهای ۳۰۰ mg و ۴۰۰ mg (گروه‌های ۲ و ۴) در مقایسه با گروه کنترل بود. اگرچه می‌توان در گروه ۴ نیز نسبت به گروه کنترل این روند کاهش را در نظر گرفت ولی مقدار کاهش در گروه ۲ نسبت به کنترل بیشتر مشهود بود. با مقایسه بین گروهی، افزایش حجم گلوبولی در گروه ۳ نسبت به گروه ۲ مشهود است که تاحدی ناشی از تأثیرات بهبوددهنده لیپاز-پانکراتین بر ساختار تغییر یافته پانکراس به دنبال تجویز ال-آرژینین با دوز ۳۰۰ mg است. در مطالعه‌ای Chen و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که NF- β آزاد شده از کلیه پس از پانکراتیت تجربی می‌تواند سبب افزایش بیان ژن‌های مربوط به واسطه‌های پیش‌آماسی TNF- α ، IL-1، IL-6 و ICAM-1 گردد که منتهی به تجمع نوتروفیل‌ها در رگ‌های کلیوی می‌گردد. تجمع نوتروفیل‌ها با ایجاد ترومبوس و ایسکمی در مویرگ‌های گلوبولی، باعث آسیب گلوبول‌ها می‌شوند (۳۴، ۳۵). سلول‌های التهابی تجمع یافته در گلوبول‌ها می‌تواند تأثیرات سمی مستقیمی را القا کند که سبب تغییرات مورفولوژی سلولی، تکثیر و تمایز، آسیب‌های مویرگی و تشکیل کرسنت در فضای کپسول بومن می‌گردد (۳۶). از آنجایی که تغییرات حجم قشر در دو گروه ۲ و ۴ نسبت به گروه کنترل به

بافتی در فاکتورهای موردنظر بود ولی در سایر فاکتورها اثری نمایان نبود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر بر خود لازم می‌دانند که از کارشناسان و پرسنل آزمایشگاه فیزیو-فارماکولوژی و هیستو-پاتولوژی و همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشکده و دانشگاه شهرکرد که امکانات لازم را برای اجرا و پیش برد این تحقیق، در اختیار قرار دادند و ما را یاری کردند تشکر و قدردانی کنند.

References

- [1]. Nøjgaard C, Becker U, Matzen P, Andersen JR, Holst C, Bendtsen F. Progression from acute to chronic pancreatitis: prognostic factors, mortality, and natural course. *Pancreas*. 2011;40(8):1195-200.
- [2]. Lunova M, Zizer E, Kucukoglu O, Schwarz C, Dillmann WH, Wagner M, et al. Hsp72 overexpression accelerates the recovery from caerulein-induced pancreatitis. *PLoS One*. 2012;7(7):e39972.
- [3]. Closa D. Free radicals and acute pancreatitis: much ado about... something. *Free Radical Research*. 2013;47(11):934-40.
- [4]. Vaquero E, Gukovsky I, Zaninovic V, Gukovskaya AS, Pandolfi SJ. Localized pancreatic NF- κ B activation and inflammatory response in taurocholate-induced pancreatitis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001;280(6):G1197-G208.
- [5]. Morris J, Sidney M. Arginine: beyond protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006;83(2):508S-12S.
- [6]. Zhou Z, Chen Y, Yu Y, Chen H. Hemorheology and expression of neutrophil adhesion molecules CD18 and CD62L in pancreatic microcirculation of Caerulein induced experimental acute pancreatitis. *Chinese Journal of Preventive Medicine*. 2002;36(7):528-30.
- [7]. Dawra R, Saluja AK. L-arginine-induced experimental acute pancreatitis. *Pancreapedia: The Exocrine Pancreas Knowledge Base*. 2012.
- [8]. Tashiro M, Schäfer C, Yao H, Ernst S, Williams J. Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells. *Gut*. 2001;49(2):241-50.
- [9]. Wilmer A. ICU management of severe acute pancreatitis. *European Journal of Internal Medicine*. 2004;15(5):274-80.
- [10]. Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Journal of Pancreas*. 2003;26(2):122-9.
- [11]. Herrera MG, Sella GP, Chaparro MS, Nacle BL. Acute renal failure profile and prognostic value in severe acute pancreatitis. *Journal of Medicina clinica*. 2000;115(19):721-5.
- [12]. Boyer A, Chadda K, Salah A, Bonmarchand G. Thrombotic microangiopathy: an atypical cause of acute renal failure in patients with acute pancreatitis. *Intensive Care Medicine*. 2004;30(6):1235-9.
- [13]. Cuthbertson C, Christophi C. Disturbances of the microcirculation in acute pancreatitis. *British Journal of Surgery*. 2006;93(5):518-30.
- [14]. Tzovaras G, Parks RW, Diamond T, Rowlands BJ. Early and long-term results of surgery for severe necrotising pancreatitis. *Journal of Digestive surgery*. 2004;21(1):41-7.

ارزیابی عملکرد ترمیمی داروی لیپاز- پانکراتین به وسیله مقایسه دوگانه بین یافته‌های گروه‌های تیمار و کنترل و نیز بین گروه‌های تیمار، می‌توان چنین برداشت کرد که تجویز این دارو باعث تعدیل تأثیر تیمار با ال-آرژینین در برخی از فاکتورهای موردبررسی گردید که تا حدی بیانگر عملکرد این دارو در حفظ ساختار بافتی این اندام بود. ولی در سایر گروه‌ها تأثیرات قابل توجهی مشاهده نشد. ارزیابی میزان حجم سنجی بافتی حاصل از تجویز دو دوز مختلف ال آرژینین در بین گروه‌های تیمار بدون لیپاز پانکراتین و همچنین در همان گروه‌ها نسبت به گروه کنترل، حاکی از قدرت بیشتر دوز بالای ال آرژینین در تغییر و کاهش حجم

- [15]. Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TSJC. The role of nuclear factor- κ B in pulmonary diseases. *American Journal of Respiratory Medicine* 2000;117(5):1482-7.
- [16]. De Waele JJ, Leppäniemi AK. Intra-abdominal hypertension in acute pancreatitis. *World Journal of Surgery*. 2009;33(6):1128-33.
- [17]. Li H, Qian Z, Liu Z, Liu X, Han X, Kang H. Risk factors and outcome of acute renal failure in patients with severe acute pancreatitis. *Journal of Critical Care*. 2010;25(2):225-9.
- [18]. Kodydkova J, Vavrova L, Stankova B, Macasek J, Krechler T, Zak A. Antioxidant status and oxidative stress markers in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Journal of Pancreas*. 2013;42(4):614-21.
- [19]. De Waele JJ, De Laet I, Kirkpatrick AW, Hoste E. Intra-abdominal hypertension and abdominal compartment syndrome. *American Journal of Kidney Diseases*. 2011;57(1):159-69.
- [20]. Cheatham ML, Malbrain ML, Kirkpatrick A, Sugrue M, Parr M, De Waele J, et al. Results from the international conference of experts on intra-abdominal hypertension and abdominal compartment syndrome. II. Recommendations. *Intensive Care Medicine*. 2007;33(6):951-62.
- [21]. Mohmand H, Goldfarb S. Renal dysfunction associated with intra-abdominal hypertension and the abdominal compartment syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(4):615-21.
- [22]. Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *Journal of Gastroenterology*. 2005;40(1):1-10.
- [23]. Thorat V, Reddy N, Bhatia S, Bapaye A, Rajkumar J, Kini D, et al. Randomised clinical trial: the efficacy and safety of pancreatin enteric-coated minimicrospheres (Creon 40000 MMS) in patients with pancreatic exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis - a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Alimentary Pharmacology Therapeutics*. 2012;36(5):426-36.
- [24]. Whitcomb D, Malecka-Panas E, Lehman G, Vasileva G, Gubergrits N, Caras S, et al. Efficacy and Safety of Pancrelipase Delayed-Release Capsules (Creon®) in Patients With Pancreatic Insufficiency Due to Chronic Pancreatitis or Pancreatic Surgery: 175. *American Journal of Gastroenterology*. 2009;104:S69-S70.
- [25]. Ramesh H, Reddy N, Bhatia S, Rajkumar J, Bapaye A, Kini D, et al. A 51-week, open-label clinical trial in India to assess the efficacy and safety of pancreatin 40000 enteric-coated minimicrospheres in patients with pancreatic exocrine insufficiency due to chronic pancreatitis. *Pancreatolgy*. 2013;13(2):133-9.
- [26]. Fatahian Dehkordi RA, Habibi A. Stereological and electron microscopic study on the internal organization of the urinary secretory units in three species of birds. *Journal of Applied Animal Research*. 2015;43(1):118-24.

- [27]. White KE. Research into the structure of the kidney glomerulus-making it count. *Micron*. 2012;43(10):1001-9.
- [28]. Mouton PR. Principles and practices of unbiased stereology: an introduction for bioscientists. *Quarterly Review of Biology*. 2003;78(4):74.
- [29]. Dawra R, Sharif R, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Saluja AK. Development of a new mouse model of acute pancreatitis induced by administration of L-arginine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2007;292(4):G1009-G18.
- [30]. Raff U, Schneider R, Gambaryan S, Seibold S, Reber M, Vornberger N, et al. L-Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron Physiology*. 2005;101(3):p39-p50.
- [31]. Petejova N, Martinek A. Acute kidney injury following acute pancreatitis: A review. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of Palacky University in Olomouc*. 2013;157(2).
- [32]. Piyush M, Sandeep V. Pathophysiology of acute kidney injury in severe acute pancreatitis-an overview *Gastroenterology and Hepatology*. 2019;10(4):242-5.
- [33]. Wajda J, Dumnicka P, Maraj M, Ceranowicz P, Kuźniewski M, Kuśnierz-Cabala B. Potential prognostic markers of acute kidney injury in the early phase of acute pancreatitis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(15):3714.
- [34]. Gu H, Liu A, Ma W, Ni J, Ma C, Zhou X, et al. Berberine hydrochloride mitigates acute pancreatitis by suppressing the TLR4/I κ B α /NF κ B pathway. *Computational life sciences*. 2020;13(1):276-85.
- [35]. Chen H, Li F, Cheng Y, Sun J. Pathogenic role of neutrophils in evolution of acute pancreatitis in rats. 2001;9(7):776-9.
- [36]. Zhang XP, Wang L, Zhou YF, sciences. The pathogenic mechanism of severe acute pancreatitis complicated with renal injury: a review of current knowledge. *Journal of Digestive diseases*. 2008;53(2):297-306.
- [37]. Zhou X, Mao Q, Chen Y, Shen H. The relationship between pathological characters and changes of oxygen free radicals in rats with acute pancreatitis. *World Chinese Journal of Digestology*. 2000;8:108-9.
- [38]. Yan Y, Ai Z, Liu Z, Xu G. Protective effect of angelica injection on acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis complicated with renal injury. *Digestive Diseases and Sciences*. 2000;9:228-30.

Stereological Study of the renal structures volume in L-arginine-induced pancreatitis and therapeutically effect of pancreatin

Rahmat Allah Fatahian Dehkordi^{1*}, Mohammad javad Yazdanpanah², Reza Khetvan²

1. Associate professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
2. Student of veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Abstract

Introduction: The aim of this study was to stereological evaluate of the protective effect of pancreatin on morphological changes in mice kidney after treatment with L-arginine.

Materials and Methods: To conduct research, 50 adult male rats weighing 30 ± 2 gr were divided into 5 groups (equal). In the control group, no administration was made. The pancreatitis induction groups received 2 doses of 300 and 400 mg/100 g body weight of L-arginine. To the induction groups with two different doses, therapeutic drug was prescribed 3.5 pp. of lipase-pancreatin. All treatments were received for 3 consecutive days once a day from L-arginine solution and 72 hours later, a lipase-pancreatin solution was administered to groups of pancreatitis for 20 days.

Results: The results showed that due to experimental pancreatitis, except for medulla volume, decreasing volume of renal cortex, proximal and distal convoluted tubules, and glomeruli was observed in the treated groups compared to the control group. By the administration of pancreatin lipase along with L-arginine, mean volume values of factors such as mean volume of renal cortex, proximal convoluted tubules and glomeruli, have gotten closed to the control group.

Conclusion: According to a final review of the findings, lipase-pancreatin solution may be partially effective in mitigating the effects of pancreatitis induced by high doses of L-arginine.

Received: 2019/11/11

Accepted: 2020/02/17

Keywords: Stereology, L-Arginine, Pancreatitis, Convoluted Tubules, Mice.