

قابل چاپ است

بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت‌های کلیه و قلب موش‌های صحرایی نر و ارزیابی آپوپتوزیس در سلول‌های میوکارد متعاقب ایسکمی - بازخونسانی کلیوی وابسته به زمان

مهید باژبان^۱، یوسف دوستار^{۲*}، میرعلیرضا نورآذر^۳

- ۱- دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
- ۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
- ۳- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

چکیده

آسیب ایسکمی - بازخونسانی (Ischemia-Reperfusion; I/R) کلیه یکی از مهم‌ترین عوامل نارسایی حاد کلیوی و متعاقب آن آسیب به اندام‌های دیگر همچون قلب به شمار می‌رود. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی وقوع آسیب و آپوپتوزیس در سلول‌های بافت قلب متعاقب آسیب ایسکمی - بازخونسانی کلیوی وابسته به زمان در موش صحرایی بود. بدین منظور ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. در گروه اول (Sham) فقط محل جراحی باز و بسته شد. در گروه دوم (۳۰- I/R) پس از القاء ایسکمی کلیوی ۳۰ دقیقه بعد، در گروه سوم (۴۵- I/R) ۴۵ دقیقه بعد و در گروه چهارم (۶۰- I/R) ۶۰ دقیقه بعد، عمل بازخونسانی انجام شدند. پس از ۲۴ ساعت همه حیوانات آسان‌کشی شده و از بافت کلیه و قلب آن‌ها جهت انجام مطالعات ریزینی، نمونه‌برداری شد. واکاوی آماری داده‌ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس‌آزمون توکی (Tukey) انجام و مقادیر $p < 0/05$ معنی‌دار تلقی شد. یافته‌های هیستوپاتولوژی، آسیب در بافت کلیه متعاقب I/R را به شکل تغییرات دژنراتیو و نکروز توبول‌های پروگزیمال و دیستال، آسیب‌های گلمرولی و بافت بینابینی به صورت وابسته به زمان نشان داد. همچنین I/R منجر به آسیب در بافت قلب حیوانات همه گروه‌ها شامل تغییرات دژنراتیو، نکروز و آپوپتوزیس کاردیومیوسیت‌ها شد، اما شدت آسیب بافتی و آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها در موش‌های گروه ۶۰- I/R به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($p < 0/05$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با کاهش مدت زمان ایسکمی در کلیه، آسیب خود بافت کلیه، بافت قلب و آپوپتوزیس کاردیومیوسیت‌ها کمتر خواهد بود.

کلیدواژه‌ها: ایسکمی - بازخونسانی، کلیه، قلب، موش صحرایی، آپوپتوزیس.

مقدمه

آسیب حاد کلیوی (Acute Kidney Injury; AKI) فرآیندی می‌باشد که با کاهش عملکرد کلیه در مدت زمان کوتاهی تشخیص داده می‌شود و معمولاً با مرگ و میر بالایی همراه است. آسیب در بازخونسازی کلیه در مواردی از جمله پیوند کلیه (kidney transplantation)، نفرکتومی پارشیال (partial nephrectomy)، جراحی‌های عروقی بزرگ کلیوی (major vascular surgery) مثل آنژیوپلاستی سرخرگ کلیه (renal artery angioplasty) و جراحی آنوریسم آئورت (aortic aneurism surgery)، اعمال جراحی انتخابی اورولوژیک (elective urologic operations)، شوک هموراژیک (hemorrhagic shock) و موارد خاص افت فشار خون (certain hypotensive states) پدیده‌ای معمول می‌باشد (Thurman 2007; Legrand *et al.*, 2008). یکی دیگر از عوامل AKI، ایسکمی کلیه می‌باشد که باعث استرس اکسیداتیو شده و منجر به پاسخ‌های شدید و طولانی التهابی پس از بازخونسازی می‌شود (Mohsen *et al.*, 2010). فرآیند ایسکمی یک معضل حیاتی می‌باشد و مهم‌تر این‌که خونرسازی مجدد متعاقب آن، منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز می‌شود. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که برقراری مجدد جریان خون در بافتی که دچار ایسکمی شده است، باعث آسیب بیشتر به آن بافت می‌شود. این فرآیند را به نام آسیب ایسکمی-بازخونسازی مجدد (Ischemia-Reperfusion Injury) نامیده‌اند. در این فرآیند، علت اصلی آسیب می‌توان به استرس اکسیداتیو و یا شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژنی (Reactive Oxygen Species; ROS) مانند سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل اشاره نمود. در (Ischemia-Reperfusion; IR) بافت‌ها متحمل آسیب‌های ساختاری مختلفی می‌شوند. می‌توان علت را این‌گونه توجیه کرد که برقراری مجدد جریان خون، سبب فراهم آوردن میزان زیاد اکسیژن برای ارگان می‌شود. این افزایش غلظت اکسیژن سبب فعال‌سازی ماکروفاژها در دیواره عروق شده و به دنبال آن رادیکال‌های مزبور آزاد می‌شوند. مرگ سلولی به دنبال آسیب IR در ارتباط نزدیک با تولید ROS و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از آن می‌باشد. بدین ترتیب که با برقراری مجدد خون، گلبول‌های سفیدخون آزادسازی فاکتورهای التهابی مانند اینترلوکین و رادیکال‌های آزاد در بافت ضایعه را موجب می‌شود (Thurman, 2007; Legrand *et al.*, 2013; Mohajeri *et al.*, 2008). AKI اغلب منجر به اختلالات در چند عضو دیگر نیز می‌شود که آن را آسیب اندام دور نام‌گذاری کرده‌اند (Miyazawa *et al.*, 2002; Grams and Rabb, 2012; Yap *et al.*, 2012; Doi and Rabb, 2016; Husain-Syed, *et al.*, 2020). در مدل تجربی حیوانی نیز نشان داده شده که IR کلیوی باعث آسیب به سایر اندام‌ها از جمله قلب، ریه، مغز، روده و کبد می‌شود (Kelly, 2003; Hassoun *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Grams and Rabb, 2012; Lane *et al.*, 2013; Druml, 2014; Ologunde *et al.*, 2014; Shang *et al.*, 2016). ایسکمی-بازخونسازی مجدد و آسیب حاد کلیوی با بالا رفتن سطح اوره پلاسما، خون، کراتینین و آسیب حاد ریوی و همچنین به علت تولید مقادیر قابل توجهی از سایتوکاین‌های متعدد که با اثر بر میزان اکسیژن‌رسانی مغز، آسیبی مضاعف بر بافت مغز اعمال می‌کند، همراه است (Park *et al.*, 2011). بیماران مبتلا به آسیب حاد کلیوی از آنسفالوپاتی اورمیک رنج می‌برند، که معمولاً با کاهش هوشیاری و تشنج و کما همراه می‌باشد (Scaini *et al.*, 2010). تغییرات در آزادسازی نوروترانسمیترهای مغزی و اختلال عملکردی در سد خونی-مغزی به دنبال نارسایی حاد کلیوی و ریوی تامین انرژی مغز را مختل می‌کند، و در نهایت تغییرات پاتولوژیک آنسفالوپاتی اورمیک اتفاق می‌افتد (Kikuchi *et al.*, 2010).

1983). با وجود این، مطالعات نشان می‌دهند که آسیب حاد کلیوی با افزایش سایتوکاین/کموکاین‌های پلاسمایی و مولکول‌های آماسی، فعال‌شدن سلول‌های ایمنی و استرس اکسیداتیو باعث آسیب سلولی با الگوی آپوپتوزیس مخصوصاً در بافت‌های قلب، مغز و کبد نیز می‌گردد (Liu et al., 2008; Karimi et al., 2017; Scheel et al., 2008). با توجه به این‌که مخصوصاً گزارش شده، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به مقدار زیاد در کلیه‌ای که دچار ایسکمی - بازخونرسانی (I/R) شده، منجر به آسیب می‌شود که روندی اجتناب‌ناپذیر در تروما، عفونت و پیوند کلیه می‌باشد (El-Abhar, 2003)، لذا با توجه به اهمیت بالای موارد ذکر شده، هدف از انجام مطالعه حاضر، ارزیابی آسیب‌های احتمالی در بافت‌های کلیه و قلب موش‌های صحرایی نر و نیز بررسی وقوع آپوپتوزیس در کاردیومیوسیت‌ها متعاقب ایسکمی - بازخونرسانی کلیوی وابسته به زمان بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بود که در سال ۱۴۰۱ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی علوم- پزشکی تبریز انجام شده و در کلیه مراحل آن، همه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی، منطبق بر اصول مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بوده است.

برای انجام پژوهش مورد نظر، از تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار خریداری شده از محل نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تبریز در سن ۱۰ هفته‌گی و با وزن 220 ± 20 گرم استفاده شد. شرایط تغذیه و وضعیت نگهداری برای تمام گروه‌های مورد مطالعه یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. جیره غذایی آماده یکسان و آب نیز به طور آزادانه در دسترس حیوانات قرار گرفت. پس از یک هفته و عادت کردن به محیط جدید، آزمایش روی موش‌ها شروع شد. بدین منظور ابتدا موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند:

موش‌های گروه اول (Sham) به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و در آن‌ها فقط محل جراحی باز و بسته شد.

در حیوانات گروه دوم (I/R-۳۰) پس از القاء ایسکمی کلیوی، ۳۰ دقیقه بعد، عمل بازخونرسانی انجام گردید.

در مورد موش‌های گروه سوم (I/R-۴۵) پس از القاء ایسکمی کلیوی، ۴۵ دقیقه بعد، عمل بازخونرسانی انجام شد.

در حیوانات گروه چهارم (I/R-۶۰) هم پس از القاء ایسکمی کلیوی، ۶۰ دقیقه بعد، عمل بازخونرسانی انجام گردید.

لازم به ذکر است که قبل از ایجاد ایسکمی و برقراری مجدد خون‌رسانی، حیوانات همه گروه‌ها توسط تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین (Alfasan, Holland) به ترتیب با دزهای 90 mg/kg و 10 mg/kg بیهوش شدند (Sancaktutar et al., 2014) و بلافاصله پس از ضدعفونی، خط وسط در قسمت میانی شکم (ناحیه مورد نظر برای جراحی) برش داده شد. همچنین در مورد موش‌های گروه شاهد (Sham) فقط به دست‌کاری عروق کلیه چپ اکتفا کرده ولی در خصوص حیوانات سایر گروه‌ها، عروق کلیه چپ به ترتیب به مدت ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه به وسیله گیره غیرضربه‌ای (non traumatic) عروقی مسدود شد (Kirkby et al., 2007). در ادامه و پس از برداشتن گیره و رفع

انسداد، در حفره شکمی بخیه زده و حیوانات به قفس‌های خود بازگردانده شدند. همچنین همه تیمارهای مورد نظر در گروه‌های مختلف تحقیق، بین ساعات ۱۴ تا ۱۹ روزهای تحقیق انجام گردید.

در نهایت ۲۴ ساعت پس از انجام عمل بازخونرسانی، همه موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg)، بیهوش گردیده و در ادامه همگی با ایجاد دررفتگی در مهره‌های گردن (cervical dislocation)، آسان‌کشی شدند (Wang et al., 2013). بلافاصله قلب موش‌ها جدا گردیده و برای بررسی آسیب‌های سلولی احتمالی، در درون فرمالین بافری (Merck, Germany) ۱۰ درصد به آزمایشگاه پاتولوژی دانشکده دامپزشکی انتقال داده شدند. در ادامه از نمونه‌های قلب و کلیه پدیدار شده در فرمالین، با استفاده از شیوه‌های معمول پاساژ و تهیه مقاطع بافتی، بلوک‌های پارافینی و سپس برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و در ادامه برش‌های حاصله، پس از رنگ آمیزی با رنگ‌های هماتوکسیلین-ئوزین، آماده بررسی شدند. در نهایت هم مشاهدات ریزینی بافتی، با استفاده از میکروسکوپ نوری Nikon (مدل ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) انجام گردید.

- بررسی آسیب‌شناختی بافت‌های کلیه و قلب موش‌های مورد آزمایش

لازم به ذکر است که برای آسیب‌شناسی بافت کلیه، مقاطع بافتی مربوط به هر نمونه‌های گروه‌های مختلف تحقیق، جداگانه و توسط یک مقیاس نیمه‌کمی (Semiquantitative scale) و به صورت دوسو کور، بر اساس روش ارائه شده توسط بالودیا و همکاران در سال ۲۰۰۹ به صورت عدم وجود آسیب (-)، وجود آسیب جزئی (+)، آسیب ملایم (++)، آسیب متوسط (+++) و آسیب شدید (+++++) ارزیابی، رتبه‌بندی و مقایسه گردیدند. همچنین آسیب گلومرول‌ها به شکل گلومرولیت، آتروفی گلومرولی، نکروز گلومرولی، اتساع فضای ادراری و گسیختگی کپسول بومن، آسیب بینابینی به شکل پرخونی، خونریزی، ادم، ارتشاح بینابینی سلول‌های آماسی و فیروز بینابینی و نیز آسیب توبولی به شکل اتساع توبولی، تغییرات دژنراتیو و نکروز سلول‌های توبولی، پهن و مسطح شدن سلول‌های توبولی، مشاهده کست‌های هیالینی داخل توبول‌ها، مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفتند (Bhalodial, et al., 2009).

بررسی مقاطع آسیب‌شناسی نمونه‌های بافت قلب موش‌های گروه‌های مختلف پژوهش حاضر نیز توسط یک مقیاس نیمه‌کمی (Semiquantitative scale) و به صورت دوسو کور طبق روش ارائه شده توسط جوکار و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد (Joukar et al., 2012) که براساس شیوه فوق، شدت آسیب‌ها از لحاظ فرایند التهابی، خونریزی، تغییرات دژنراتیو و نکروز، از صفر تا ۴ (صفر: عدم وجود آسیب، ۱: حداقل آسیب، ۲: آسیب ملایم، ۳: آسیب متوسط و ۴: آسیب شدید) رتبه‌بندی شدند.

- ارزیابی آپوپتوزیس در سلول‌های میوکاردا قلب موش‌های مورد آزمایش: بدین منظور از روش آنکسین وی-فلوئورسین ایزوتیوسیانات (Annexin V- Fluorescein isothiocyanate; Annexin V-FITC) استفاده گردید. بدین منظور ابتدا از بلوک‌های پارافینی نمونه‌های بافت قلب موش‌ها، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون برای رنگ‌آمیزی اختصاصی FITC تهیه گردید. در ادامه مشاهدات میکروسکوپی جهت شمارش سلول‌های آپوپتوتیک، با بزرگنمایی ۴۰× و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش بافتی به‌طور تصادفی و با استفاده از میکروسکوپ نوری Nikon (مدل ECLIPSE E200، ساخت کشور ژاپن) انجام و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک مشخص شده و میانگین آن‌ها به صورت نسبت سلول‌های

آپتوتیک به کل سلول‌های شمارش شده ارائه گردید. لازم به ذکر است که تشخیص سلول‌های آپتوتیک با استفاده از تکنیک اختصاصی و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت (BioActs Co., Ltd., Korea)، به شرح مراحل زیر انجام گرفت:

۱- شفاف‌سازی) اسلایدها در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی زایلین (Merck, Germany) به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور گردیدند تا پارافین متصل به لام جدا شده، زایلین جایگزین گردد و سپس یک بار دیگر شستشو داده شدند. پس از آن، لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی اتانول ۱۰۰ درصد غوطه‌ور شدند.

۲- آبدهی مجدد) اسلایدها در یک لوله مخروطی حاوی به ترتیب ۱۰۰، ۹۵، ۸۵، ۷۰ و ۵۰ درصد اتانول به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق غوطه‌ور شدند.

۳- تثبیت اولیه) اسلایدها در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی PBS به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس لام‌ها در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی پارافورمالدئید ۴ درصد در PBS (pH=۷/۴) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند.

۴- تمیز کردن) اسلایدها در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی PBS به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شده، PBS تازه جایگزین گردید. در ادامه عمل مذکور یک بار دیگر تکرار شد.

۵- نفوذپذیری) محلول از برش‌های بافتی زدوده شد و روی سطح صاف قرار داده شد. برش‌های بافت با ۱۰۰ میکرولیتر ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پروتئیناز K در هر لام پوشانیده شد و به مدت ۸ تا ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد.

۶- تثبیت ثانویه) اسلایدها در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی PBS به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق فرو گردید. سپس لام‌ها در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی پارافورمالدئید ۴ درصد در PBS (pH=۷/۴)، به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد.

۷- تمیز کردن) اسلایدها در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محلول PBS به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و PBS یک بار دیگر جایگزین شد.

۸- تعادل بافر) PBS روی لام‌ها، با ضربه زدن روی هر لام، جدا گردید، سلول‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر بافر واکنش ۱X، پنج برابر بافر رقیق شده ۵X پوشانیده شد و در دمای اتاق به مدت ۱۰-۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید.

۹- آماده سازی محلول رنگ آمیزی) معرف رنگ آمیزی در طول فرآیند آماده شد.

۱۰- رنگ آمیزی) PBS باقی مانده از سلول‌ها جدا گردیده و معرف رنگ آمیزی (۵۰ میکرولیتر در هر ۵ سانتی متر مربع) به آن اضافه گردید. روی آن با ورقه پوششی پوشانیده شد و لام در یک محفظه مرطوب با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت در تاریکی قرار داده شد.

۱۱- رنگ آمیزی خاموش) بافر شستشو ۲X، تهیه شده از رقت ۱۰ برابری بافر شستشوی ۲۰X، به یک لوله مخروطی ۵۰ میلی لیتری اضافه شد. اسلاید رنگ آمیزی به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس در لوله بافر شستشو ۲X غوطه‌ور شد.

۱۲- تمیز کردن) اسلایدها به مدت ۵ دقیقه در یک لوله مخروطی ۵۰ میلی لیتری حاوی PBS قرار داده شد. رنگ dUTP (۲'-Deoxyuridine, 5'-Triphosphate) واکنش نداده، با دو بار دیگر تکرار عمل فوق، حذف شد.

رنگ آمیزی PI (Propidium Iodide):

۱- یک لوله مخروطی ۵۰ میلی لیتری با محلول PI رقیق شده در ۱ میکروگرم در میلی لیتر در PBS پر شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی قرار داده شد.

۲- پس از رنگ آمیزی، لام به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر با دمای ۲۵ درجه سلسیوس فرو گردید. در ادامه آب مقطر جایگزین شده و عمل فوق سه بار تکرار گردید.

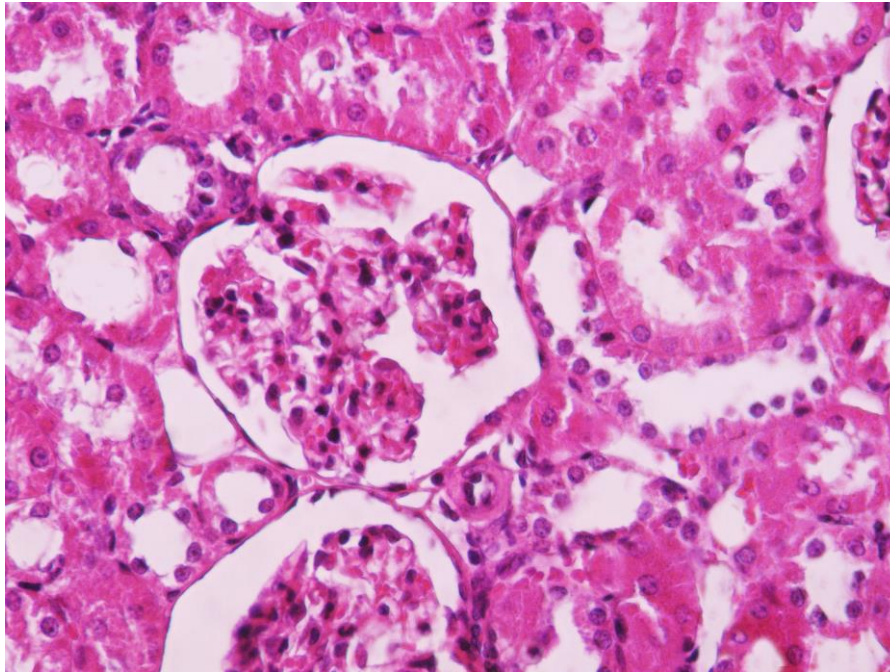
۳- لام خشک گردیده و با میکروسکوپ (Nikon, Japan) مشاهدات لازم انجام شد.

-تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های کمی به دست آمده در تحقیق، به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SD) ارائه و معنی داری اختلافات مشاهده شده بین گروه‌ها، توسط آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور تحلیل داده‌های کمی جمع‌آوری شده، از نرم‌افزار SPSS-23 استفاده شد. برای مقایسه درجات آسیب در بافت‌های قلب و کلیه، از آزمون‌های غیرپارامتری (Nonparametric) کروسکال والیس (The Kruskal Wallis Test) و تعقیبی یومن وایتنی (Mann Witney U Test) استفاده شد. اختلافات در سطح $p < 0.05$ معنی دار تلقی شدند.

یافته‌ها

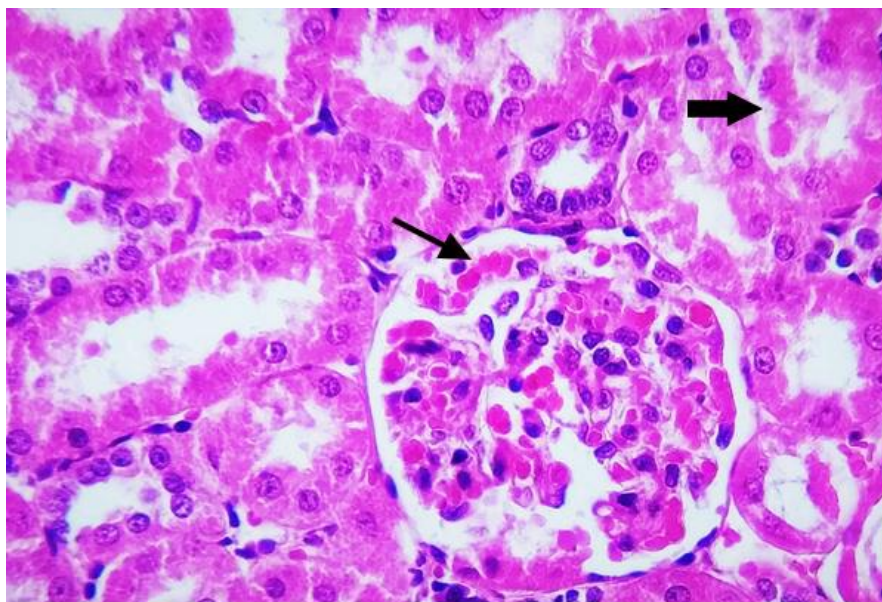
- نتایج آسیب‌شناسی بافت کلیه

در بررسی‌های میکروسکوپی، کلیه‌های موش‌های صحرایی گروه شم (شاهد جراحی)، ساختار بافتی کاملاً سالم و طبیعی داشتند و تغییر پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای در آن‌ها دیده نشد (شکل ۱).



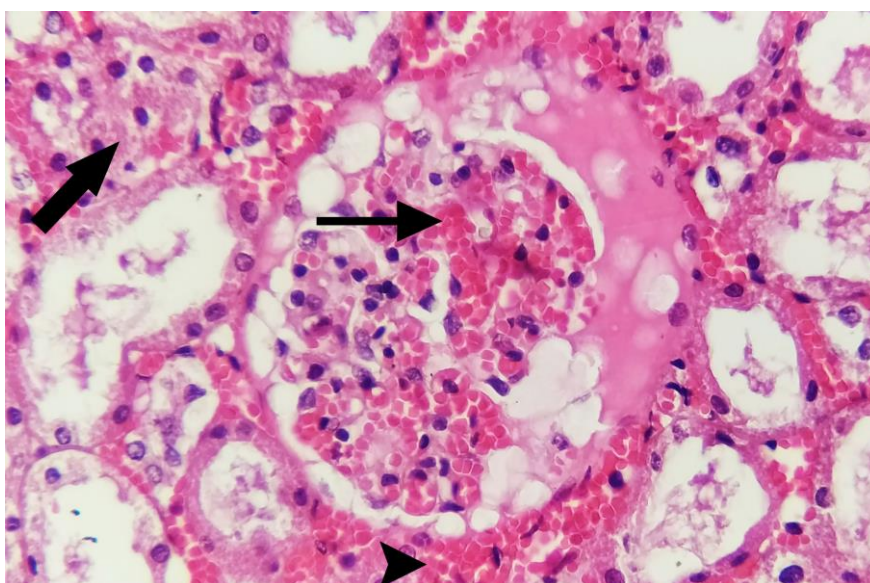
شکل ۱- نمای ریزبینی از منطقه قشری بافت کلیه موش‌های گروه شم که نشان می‌دهد ساختار بافتی کلیه طبیعی بوده و تغییر پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای در آن دیده نمی‌شود (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۱۰۰×).

اما در گروه ۳۰-I/R، تغییرات بافتی کلیه موش‌ها شامل تغییرات ملایم تا متوسط دژنراتیو و نکروز پراکنده سلول‌های پوششی توبول‌ها بود. در فضای بینابینی نیز میزان هجوم سلول‌های التهابی منونوکلئار، پرخونی، خونریزی و ادم، در حد ملایم تا متوسط بود. میزان آسیب در گلوبول‌ها شامل تغییرات دژنراتیو و نکروز سلول‌های لایه‌های جداری و احشایی کپسول بومن و کلافه مویرگی و پرخونی نیز در حد ملایم مشاهده شد (شکل ۲).



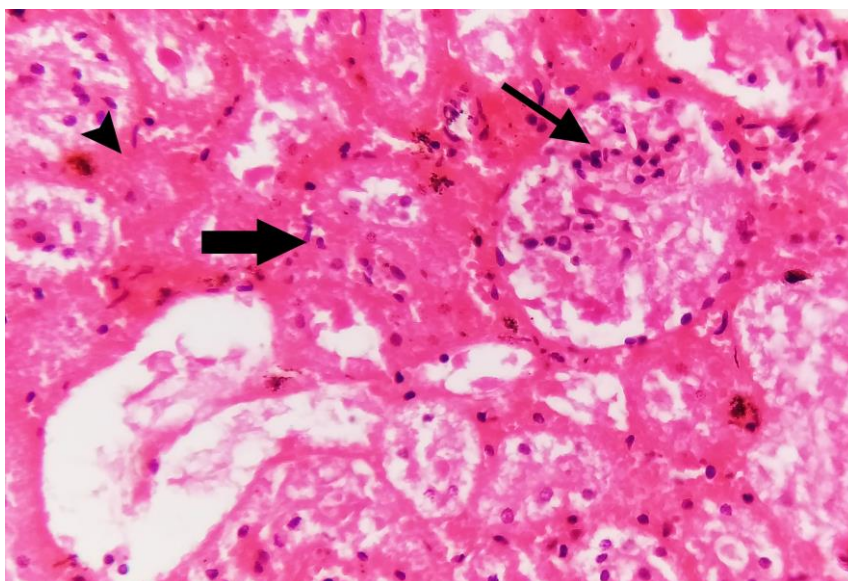
شکل ۲- نمای ریزبینی از منطقه قشری بافت کلیه یک سر موش صحرایی از گروه I/R-۳۰. به شکل تغییرات ملایم تا متوسط دژنراتیو همراه با نکروز ملایم تا متوسط سلول‌های اپیتلیال توبولی (پیکان ضخیم) و تغییرات خفیف تا ملایم دژنراتیو در گلومرول‌ها همراه با پرخونی ملایم در کلافه مویرگی گلومرولی (پیکان نازک) توجه شود (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 100$).

همچنین در گروه I/R-۴۵، تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده در بافت کلیه موش‌ها، شامل تغییرات متوسط دژنراتیو و نکروز در سلول‌های پوششی توبول‌ها بود. میزان هجوم سلول‌های التهابی منونوکلتر نیز در حد متوسط مشاهده شد. آسیب گلومرول‌ها شامل تغییرات دژنراتیو و نکروز سلول‌های لایه‌های جداری و احشایی کپسول بومن و کلافه مویرگی و پرخونی در حد متوسط بود. پرخونی و ادم در فضای بینابینی نیز در حد متوسط بود (شکل ۳).



شکل ۳- نمای ریزبینی از منطقه قشری بافت کلیه یک سر موش صحرایی از گروه I/R-۴۵. تغییرات متوسط دژنراتیو و نکروز در سلول‌های اپیتلیال توبولی (پیکان ضخیم) و تغییرات متوسط دژنراتیو در گلومرول‌ها همراه با پرخونی کلافه مویرگی گلومرولی در حد متوسط (پیکان نازک) و همچنین پرخونی و خونریزی همراه با ادم متوسط در فضای بینابینی (نوک پیکان) مشاهده می‌شود (هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 100$).

در گروه I/R-۶۰ هم، آسیب در منطقه قشری کلیه به صورت تغییرات شدید دژنراتیو سلول‌های اپیتلیال توبولی به شکل دژنراسیون هیدروپیک شدید سیتوپلاسم، نکروز حاد و شدید سلول‌های پوششی توبولی، ادم و هجوم شدید سلول‌های التهابی منونوکلتر توأم با پرخونی و خونریزی شدید در مناطق بینابینی مشاهده شد. در گلومرول‌ها نیز تغییرات شدید دژنراتیو و نکروز سلول‌های لایه‌های احشایی و جداری کپسول بومن همراه با آتروفی کلافه مویرگی گلومرولی و افزایش فضای ادراری و گاهاً پارگی کپسول بومن، همراه با پرخونی و خونریزی گسترده در کلافه گلومرول‌ها مشخص بود (شکل ۴).



شکل ۴- نمای ریزبینی از منطقه قشری بافت کلیه یک سر موش صحرائی از گروه I/R-۶۰. تغییرات دژنراتیو و نکروز گسترده و شدید سلول‌های پوششی توبولی (پیکان ضخیم) قابل مشاهده است. تغییرات شدید دژنراتیو و نکروز و آتروفی گلوبولاری همراه با پرخونی و خونریزی در کلافه مویرگی گلوبولاری (پیکان باریک) نیز مشاهده می‌شود. همچنین ادم و آماس شدید در فضای بافت بینابینی بافت کلیه (نوک پیکان) قابل مشاهده است (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ۱۰۰x).

از طرف دیگر، درجه‌بندی و مقایسه آسیب‌های بافت کلیه در تمامی گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه گردیده- است.

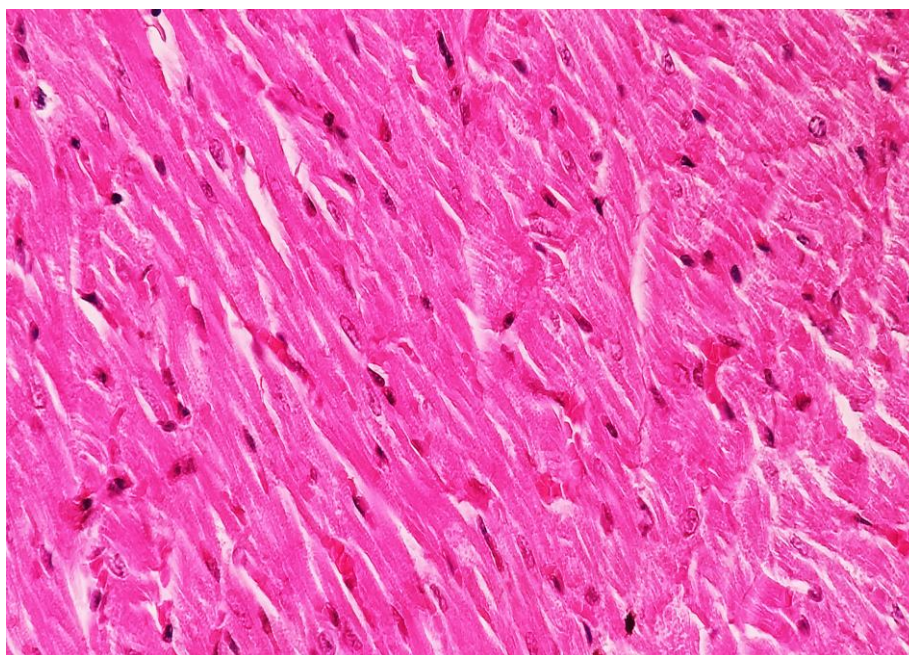
جدول ۱- مقایسه آسیب‌های بافتی در کلیه موش‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه متعاقب ایسکمی- بازخونسازی وابسته به زمان

گروه	آسیب مشاهده شده	آسیب گلوبولاری	تغییرات دژنراتیو سلول‌های توبولی	تغییرات نکروز سلول‌های توبولی	پرخونی و خونریزی	آماس
شم	-	-	-	-	-	-
I/R-۳۰	++	++	++/+++	++/+++	++/+++	++
I/R-۴۵	+++	+++	+++	+++	+++	+++
I/R-۶۰	++++	++++	++++	++++	++++	++++

(-) عدم وجود آسیب، (+) آسیب پاتولوژیک جزئی، (++) آسیب ملایم، (+++) آسیب متوسط و (++++) آسیب شدید.

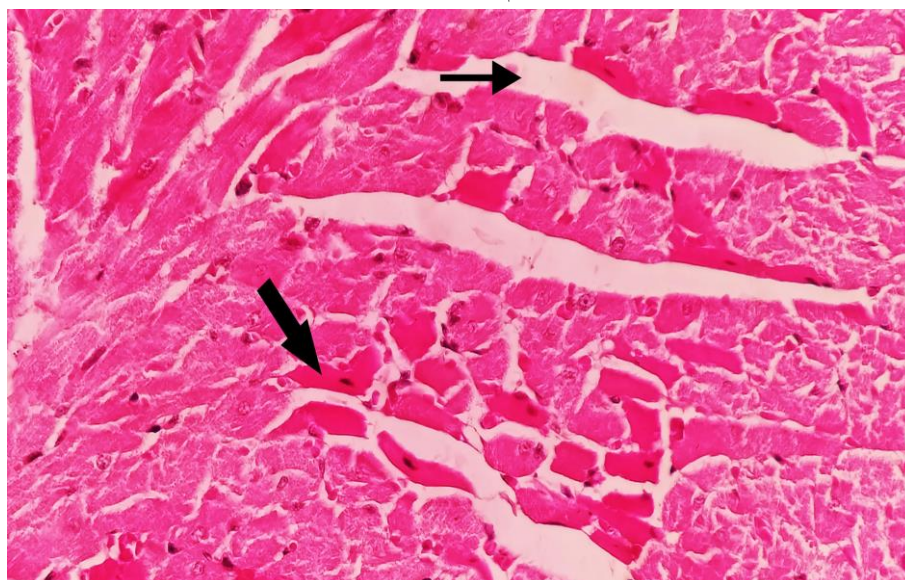
- نتایج آسیب‌شناسی بافت قلب

در بررسی‌های آسیب‌شناختی، مشخص شد که ساختار ریزبینی بافت قلب موش‌های صحرائی گروه شم، طبیعی و سالم می‌باشد (شکل ۵).



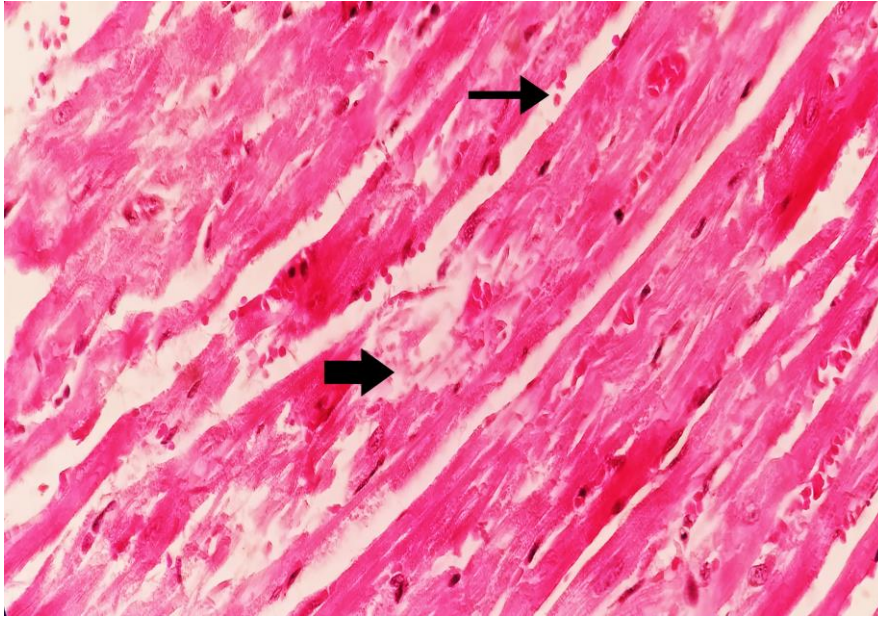
شکل ۵- نمای ریزبینی از بافت قلب موش مربوط به گروه شم که مشاهده می‌گردد که ساختار میکروسکوپی بافت قلب سالم بوده و تغییر پاتولوژیک قابل توجهی در آن دیده نمی‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 40$).

اما در گروه $I/R-30$ ، تغییرات بافتی مشاهده شده در قلب موش‌ها، عمدتاً به شکل پرخونی و خونریزی ملایم تا متوسط و ادم بینابینی متوسط و تغییرات دژنراتیو و نکروز ملایم تا متوسط کاردیومیوسیت‌ها بود (شکل ۶).



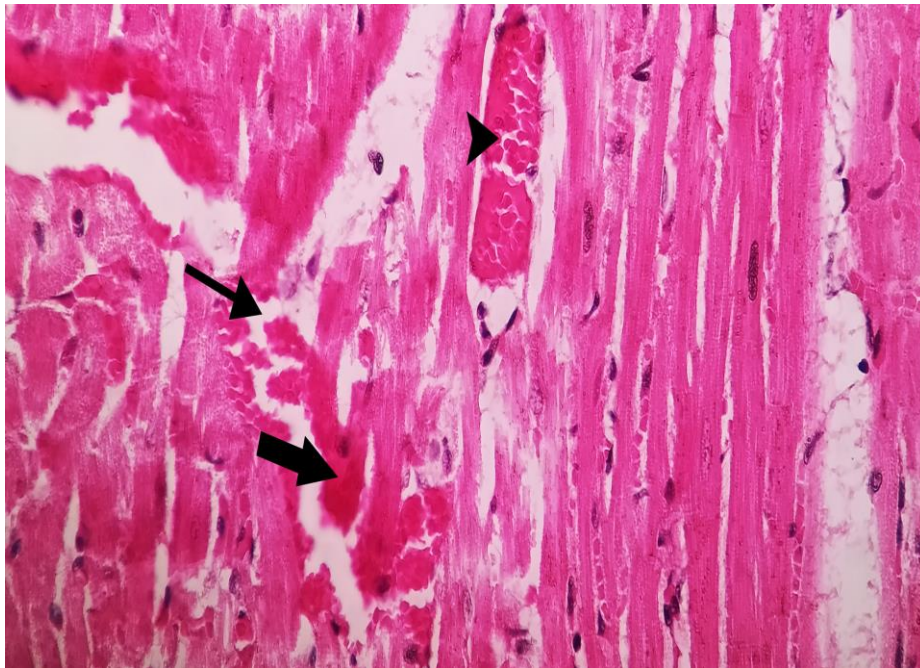
شکل ۶- نمای ریزبینی از بافت قلب موش مربوط به گروه $I/R-30$ که در آن تغییرات دژنراتیو و نکروز ملایم میوسیت‌ها (پیکان ضخیم) و ادم بینابینی ملایم (پیکان نازک) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 40$).

در گروه $I/R-45$ هم عمده آسیب قابل مشاهده در بافت قلب موش‌ها، شامل پرخونی و خونریزی متوسط و ادم بینابینی متوسط و تغییرات دژنراتیو و نکروز متوسط کاردیومیوسیت‌ها بود (شکل ۷).



شکل ۷- نمای ریزینی از بافت قلب موش گروه I/R-۴۵. به تغییرات دژنراتیو و نکروز متوسط تارهای عضلانی قلب (پیکان ضخیم) و ادم بینابینی و پرخونی و خونریزی‌های متوسط و پراکنده در فضاها (پیکان نازک) توجه شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین، درشت‌نمایی $\times 40$).

اما در بافت قلب موش‌های صحرایی گروه I/R-۶۰، تغییرات دژنراتیو و نکروز شدید تارهای عضلانی قلب، ارتشاح سلول‌های آماسی و پرخونی و خونریزی و ادم بینابینی شدید، مشاهده شد (شکل ۸).



شکل ۸- نمای ریزبینی از بافت قلب موش مربوط به گروه I/R-۶۰ که در آن تغییرات دژنراتیو و نکروز وسیع و شدید تارهای عضلانی قلب، نفوذ منتشر سلول‌های آماسی، پرخونی (نوک پیکان)، ادم بینابینی و خونریزی‌های گسترده در فضای بین تارهای عضلانی (پیکان نازک) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، درشت‌نمایی $\times 40$).

از طرف دیگر، تغییرات و شدت آسیب‌های بافتی مشاهده شده در قلب موش‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه هم در جدول ۲، درجه‌بندی و مقایسه گردیده‌است.

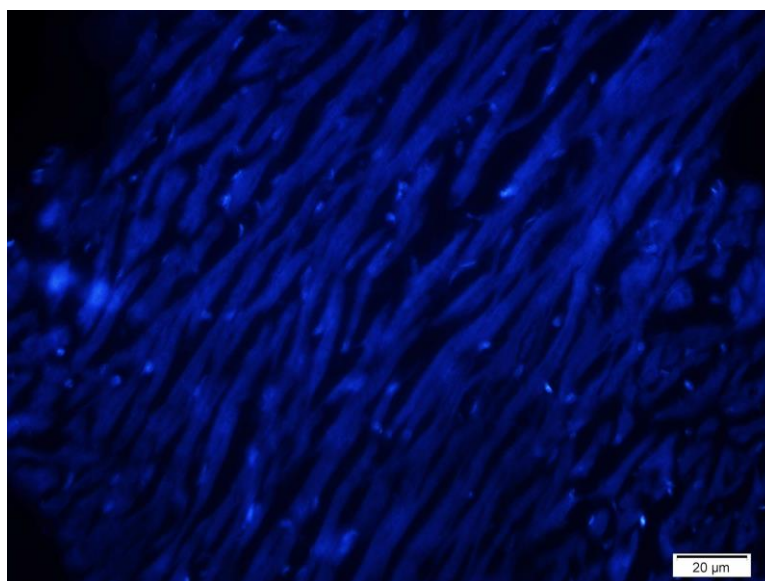
جدول ۲- مقایسه تغییرات و شدت آسیب بافتی قلب موش‌های گروه‌های مورد مطالعه متعاقب ایسکمی-بازخونسازی وابسته به زمان

گروه	آسیب مشاهده شده	درجه آسیب بافت	نتیجه آزمون کروسکال والیس
شم		$0/0 \pm 0/0^a$	
I/R-۳۰		$3/85 \pm 0/52^b$	$p < 0/01$
I/R-۴۵		$2/68 \pm 0/36^c$	
I/R-۶۰		$1/95 \pm 0/22^d$	

a,b,c,d حروف انگلیسی غیر مشابه نشان‌گر اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0/01$).

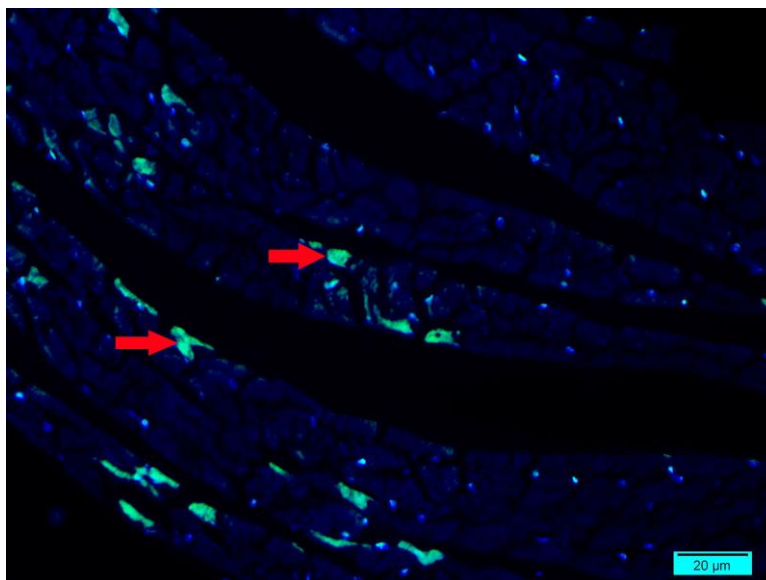
-نتایج حاصله از بررسی آپوپتوزیس سلول‌های میوکارد قلب

در مشاهدات ریزبینی کاردیومیوسیت‌های آپوپتوتیک با رنگ‌آمیزی فلوروسین ایزوسیانیید ایمنوفلوروسانس تانل، به‌رنگ سبز درخشان قابل رویت بودند. البته در بافت قلب موش‌های گروه شم تعداد کاردیومیوسیت‌های آپوپتوتیک بسیار اندک و محدود بوده و به ندرت قابل مشاهده بود (شکل ۹).



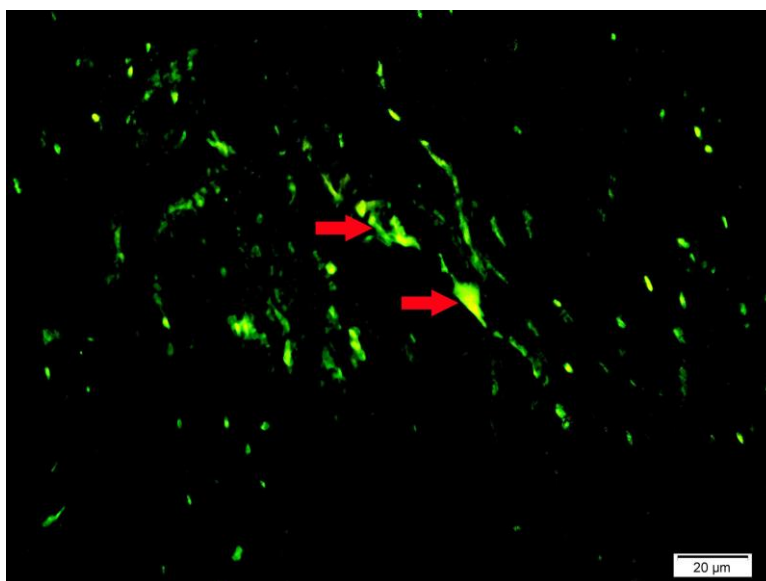
شکل ۹- نمای ریزبینی از بافت قلب موش صحرائی گروه شم. بافت طبیعی قلب قابل رویت می‌باشد (فلوروسین ایزوسیانیید ایمنوفلوروسانس تانل، درشت‌نمایی $\times 40$).

اما مطابق شکل ۱۰، در بافت قلب موش‌های گروه I/R-۳۰، کاردیومیوسیت‌های آپوپتوتیک در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/05$).



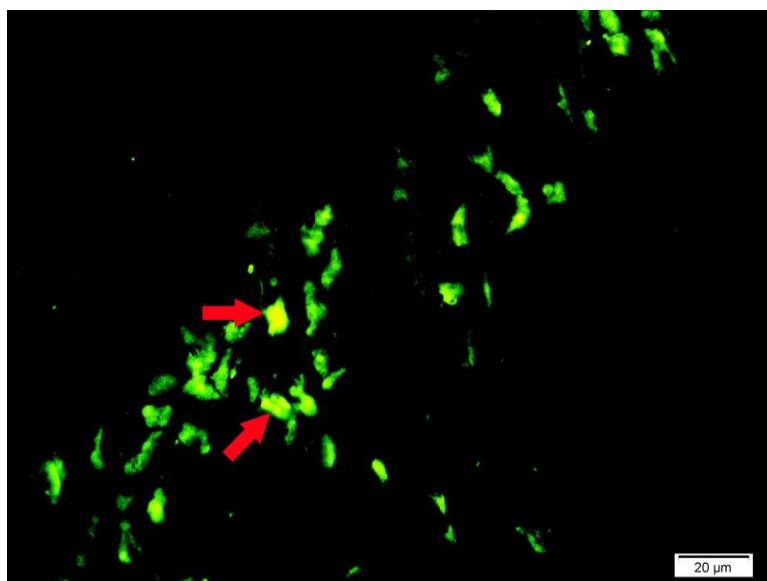
شکل ۱۰- نمای ریزبینی از بافت قلب موش صحرائی گروه I/R-۳۰. سلول‌های تانل مثبت (پیکان‌ها) قابل رویت می‌باشند (رنگ آمیزی فلوروسین ایزوسیانید ایمنوفلوروسانس تانل، درشت‌نمایی $\times 40$).

همچنین در بافت قلب موش‌های گروه I/R-۴۵، تعداد کاردیومیوسیت‌های آپوپتوتیک به‌طور معنی‌داری نسبت به تعداد آن در قلب حیوانات گروه‌های شاهد ($p < 0/01$) و I/R-۳۰ ($p < 0/05$) افزایش داشت (شکل ۱۱).



شکل ۱۱- نمای ریزبینی از بافت قلب موش صحرائی گروه I/R-۴۵ که در آن سلول‌های تانل مثبت (پیکان‌ها) قابل رویت می‌باشند (رنگ آمیزی فلوروسین ایزوسیانید ایمنوفلوروسانس تانل، درشت‌نمایی $\times 40$).

در بافت قلب موش‌های گروه I/R-۶۰ هم، تعداد کاردیومیوسیت‌های آپوپتوتیک به شدت زیاد شده بود به طوری که نسبت به تعداد آن‌ها در بافت قلب حیوانات گروه‌های شاهد ($p < 0/001$) و I/R-۴۵ ($p < 0/05$) به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (شکل ۱۲). مقایسه میزان وقوع آپوپتوزیس در سلول‌های عضلانی قلب به روش فلوروسین ایزوسیانات ارتقاء یافته بین گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۳ ارائه شده است.



شکل ۱۲- نمای ریزیی از بافت قلب موش صحرائی گروه I/R-۶۰. سلول‌های تانل مثبت (پیکان‌ها) قابل رویت می‌باشند (رنگ آمیزی فلوروسین ایزوسیانید ایمنوفلوروسانس تانل، درشت‌نمایی $\times 40$).

جدول ۳- مقایسه میزان وقوع آپوپتوزیس در سلول‌های عضلانی قلب به روش فلوروسین ایزوسیانات ارتقاء یافته بین گروه‌های مورد مطالعه (میانگین \pm انحراف معیار)

گروه‌ها	تیمار	سلول‌های آپوپتوتیک (درصد)
۱	شاهد	$0/35 \pm 0/15$
۲	I/R	$5/28 \pm 1/16^a$
۳	I/R + ورزش هوازی به مدت ۲ هفته	$8/28 \pm 2/11^b$
۴	I/R + ورزش منظم و فزاینده هوازی به مدت ۸ هفته	$14/75 \pm 4/19^c$

a: وجود اختلاف آماری معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p < 0/05$).

b: وجود اختلاف آماری معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p < 0/01$).

c: وجود اختلاف آماری معنی‌دار در مقایسه با گروه شاهد ($p < 0/001$).

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر تاثیر I/R کلیوی در زمان‌های ۳۰، ۴۵ و ۶۰ بر آسیب بافت‌های کلیوی و عضله قلب بررسی شد. آسیب کلیوی متعاقب I/R، شامل تغییرات دژنراتیو و نکروز توبول‌های پروگزیمال و دیستال، حضور کست‌های پروتئینی در توبول‌های کلیوی، خونریزی، از بین رفتن رأس مسواکی توبول‌های پروگزیمال و همچنین آسیب بافت قلب شامل تغییرات دژنراتیو و نکروز کاردیومیوسیت‌ها همراه با ادم، پرخونی و خونریزی در بافت همبند بینابینی به صورت وابسته به زمان افزایش شدت نشان داد. یافته‌های ایمنو‌هیستوشیمی (Annexin V-FITC) بافت قلب موش‌ها هم دال بر وقوع آپوپتوزیس در سبول‌های بافت پوششی توبول‌های پروگزیمال دارد. نتایج مشاهدات هیستوپاتولوژی بافت‌های کلیه و قلب حیوانات گروه‌های مختلف تحقیق هم تغییرات شدت آسیب را در گروه‌های مذکور تایید می‌کند به طوری که شدت تغییرات مذکور در بافت‌های موش‌های گروه ۶۰-I/R به طور معنی‌داری بیشتر از بقیه گروه‌ها بود.

در شرایط بالینی یکی از عوامل نارسایی حاد کلیوی، آسیب I/R می‌باشد که می‌تواند موجب آسیب غیرقابل برگشت کلیه، اختلال در عملکرد ارگان‌های دور همچون کبد، مغز و قلب و همچنین مرگ و میر شود. از آنجایی که استرس اکسیداتیو و التهاب در اندام‌ها از مشخصات آسیب ناشی از I/R می‌باشد، مداخلاتی که این فرآیندها را هدف قرار می‌دهند، در کنترل اثرات مضر I/R مفید خواهد بود (Patschan, 2012). یکی از این مداخله‌ها کاهش مدت زمان I/R می‌باشد. طبق نتایج مطالعه حاضر با کاهش مدت زمان ایسکمی، آسیب‌های ایجادشده در کلیه و قلب از جمله میزان وقوع آپوپتوزیس در سلول‌های عضلانی بافت قلب، به مراتب کاهش یافت، طوری که طبق نتایج مشخص شد که میزان آپوپتوزیس در زمان ۳۰ دقیقه، کمتر از زمان ۴۵ و ۶۰ دقیقه می‌باشد که نشانگر آسیب بیشتر به دنبال افزایش مدت زمان ایسکمی می‌باشد.

I/R در کلیه ممکن است اثرات مخرب شدیدی بر بافت‌های اندام دور همچون قلب ایجاد کند. برخی از مکانیسم‌های آسیب‌های اندام دور ناشی از I/R کلیه شامل اختلالات میکروواسکولار، اختلال متابولیسم، آسیب اکسیداتیو، افزایش آسیب سلول‌های اندوتلیال و التهابات موضعی می‌باشد. این فرآیندها به دنبال ایسکمی - بازخونسازی، باعث آسیب به یکپارچگی عملکردی و ساختاری اندام‌هایی غیر از کلیه نیز می‌شود (Quoilin et al., 2014). در مطالعه علی‌همتی و همکاران در سال ۲۰۱۷، متعاقب ایسکمی بازخونسازی کلیه، آپوپتوزیس سلول‌های میوکاردا و به همراه آن دژنراسیون میوفیبریل‌های میوکاردا به همراه خونریزی و حتی ادم مشهود بود. همچنین به دنبال آسیب‌های قلبی ناشی از I/R کلیوی، افزایش سلول‌های التهابی و افزایش عوامل القاءگر آپوپتوزیس دیده شده است. طبق نظر نامبردگان، آسیب ایسکمی منجر به التهاب سیستمیک شده و نهایتاً باعث افزایش میزان وقوع آپوپتوزیس در میوکاردا می‌شود (Alihemmati et al., 2018). ملاحظه می‌شود که یافته‌های مذکور با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا می‌باشد. لذا با توجه به هم‌راستا بودن نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر با یافته‌های مطالعه علی‌همتی و همکاران، به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های فوق را می‌توان به یافته‌های مطالعه حاضر هم تعمیم داد. همچنین در این خصوص، شیل و همکاران در سال ۲۰۰۸ به این نتیجه رسیدند که یکی از فرضیات در مورد علت وقوع آسیب قلبی به دنبال I/R کلیوی، آنسفالوپاتی اورمیک می‌باشد که می‌تواند منجر به افزایش سیتوکاین‌های التهابی IL-1 و TNF- α و ارتشاح بیشتر نوتروفیل‌ها،

افزایش وقوع آپوپتوزیس و کاهش ظرفیت بطن چپ در فشار سیستولی گردد (Scheel *et al.*, 2008). همچنین گزارش شده که یکی دیگر از مکانیسم‌های آسیب رسان این است که ایسکمی باعث افزایش بیان مولکول‌های چسبندگی و تولید واسطه‌های التهابی مثل سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها توسط اندوتلیوم عروق و توبول‌ها شده که منجر به جذب لوکوسیت‌ها به بافت می‌شوند. مولکول‌های چسبندگی سلولی (cellular adhesion molecules; CAMs) مولکول‌هایی هستند که بافت‌های بدن را در کنار هم نگه می‌دارند و در اتصال لوکوسیت‌ها به سلول‌های اندوتلیال نقش دارند. مولکول‌های چسبندگی مثل اینتگرین و سلکتین در کنار سایتوکاین‌های پیش‌التهابی آسیب سلولی را افزایش می‌دهند (Garcia-Criado *et al.*, 1998; Thurman, 2007; Li *et al.*, 2016). بنابراین، پاسخ التهابی نقش مهمی در آسیب بافتی ناشی از IR دارد (Thurman, 2007). در هنگام IR کلیه، سیتوکین‌های پیش‌التهابی تولیدشده در کلیه به عنوان عامل اصلی در التهاب موضعی و سیستمیک در نظر گرفته می‌شوند (Wang *et al.*, 2013; Ologunde *et al.*, 2014; Nuclear factor kappa B;) فاکتور هسته‌ای-کاپا B (Lee *et al.*, 2011; Akcay *et al.*, 2009; Sung *et al.*, 2002) یکی از عوامل اصلی رونویسی است که بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی و پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کند (Sung *et al.*, 2017; Lawrence, 2009; Liu *et al.*, 2017). طبق مطالعه انجام شده‌ای در این خصوص بیان کرده‌اند که IR بیان کموکاین (Monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) را از طریق فعال‌سازی NF-kB در کلیه تحریک می‌کند (Sung *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013). دویی و راب در سال ۲۰۱۶ طی یک مطالعه بیان نمود که به دنبال نارسایی حاد کلیوی متعاقب ایسکمی-بازخونرسانی، با ایجاد ناهماهنگی دینامیکی غشای میتوکندریای سلول‌های میوکارد قلب، بیان ژن وابسته به Drp-1 (Dynamic-related protein-1) افزایش یافته و از این طریق باعث القاء آپوپتوزیس سلولی می‌گردد. دینامیک میتوکندریایی همان پیوستگی یا Fusion و گسستگی یا Fission در غشاء میتوکندری می‌باشد که توسط گوانوزین تری فسفات واسطه‌گری می‌گردد. شکاف در غشاء باعث خروج سیتوکروم C از میتوکندری و فعال شدن آنزیم‌های کسپازی و در نتیجه آپوپتوزیس سلول‌های میوکارد می‌گردد (Doi and Rabb, 2016).

بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان بیان کرد که با کاهش مدت زمان ایسکمی در آسیب I/R کلیه و رخداد فرآیندهای التهابی و سیتوکاین‌های القاء‌گر آپوپتوزیس و فعال شدن مسیرهای درونزاد آپوپتوزیس کاردیومیوسیت‌ها، آسیب در بافت قلب به دنبال کاهش مدت زمان ایسکمی کلیه، کمتر می‌شود. در مجموع، طبق نتایج مطالعه ما و یافته‌های تحقیقات قبلی، کاهش مدت زمان ایسکمی کلیه، با حداقل آسیب قلبی همراه است.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره دکترای حرفه‌ای (کد: ۱۰۲۲۱۳۷۵۶۴۸۶۹۱۱۴۰۰۱۶۲۴۲۷۶۷۳) می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

منابع

- Akcaay, A., Nguyen, Q. and Edelstein, C.L. (2009). Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators of inflammation*, 200: 137072.
- Alihemmati, A., Yousefi, H., Ahmadiasl, N. and Habibi, P. (2018). Apoptosis and histopathology of the heart after renal ischemia-reperfusion in male rat running title: ischemia-reperfusion injury. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60.
- Bhalodia, Y., Kanzariya, N., Patel, R., Patel, N., Vaghasiya, J., Jivani, N., *et al.* (2009). Renoprotective activity of benincasa cerifera fruit extract on ischemia/reperfusion-induced renal damage in rat. *International Journal of Kidney Diseases*, 2009, 3(2): 80
- Doi, K. and Rabb, H. (2016). Impact of acute kidney injury on distant organ function: recent findings and potential therapeutic targets. *Kidney international*, 89(3): 555-564.
- Druml, W. (2014). Systemic consequences of acute kidney injury. *Current opinion in critical care*, 20(6): 613-619.
- El-Abhar, H.S., Abdallah, D.M. and Saleh, S. (2003). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 84(2-3): 251-258.
- Garcia-Criado, F.J., Eleno, N., Santos-Benito, F., Valdunciel, J.J., Reverte, M., Lozano-Sanchez, F.S., *et al.* (1998). protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia-reperfusion. *Transplantation*, 66(8): 982-990.
- Grams, M.E. and Rabb, H. (2012). The distant organ effects of acute kidney injury. *Kidney international*, 81(10): 942-948.
- Hassoun, H.T., Grigoryev, D.N., Lie, M.L., Liu, M., Cheadle, C., Tuder, R.M., *et al.* (2007). Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(1): F30-F40.
- Husain-Syed, F., Rosner, M.H. and Ronco, C. (2020). Distant organ dysfunction in acute kidney injury. *Acta Physiologica*, 228(2): e13357.
- Joukar, S., Bashiri, H., Dabiri, S., Ghotbi, P., Sarveazad, A., Divsalar, K., *et al.* (2012): Cardiovascular effects of black tea and nicotine alone or in combination against experimental induced heart injury. *Journal of physiology and biochemistry*. 68(2): 271-279.
- Karimi, N., Haghani, M., Noorafshan, A. and Moosavi, S.M.S. (2017). Structural and functional disorders of hippocampus following ischemia/reperfusion in lower limbs and kidneys. *Neuroscience*, 358: 238-248.
- Kelly, K.J. (2003). Distant effects of experimental renal ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(6): 1549-1558.
- Kikuchi, S., Matsumoto, H. and Ito, M. (1983). Free amino acid changes in the cerebral cortex of experimental uremic rat. *Neurochemical Research*, 8(3): 313-318.
- Kirkby, K., Baylis, C., Agarwal, A., Croker, B., Archer, L. and Adin, C. (2007). Intravenous bilirubin provides incomplete protection against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(2): F888-F894.
- Lane, K., Dixon, J.J., MacPhee, I.A. and Philips, B.J. (2013). Renohepatic crosstalk: does acute kidney injury cause liver dysfunction?. *Nephrology dialysis transplantation*, 28(7): 1634-1647.
- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6): a001651.
- Lee, D.W., Faubel, S. and Edelstein, C. (2011). Cytokines in acute kidney injury (AKI). *Clinical nephrology*, 76(3): 165-173.
- Legrand, M., Mik, E.G., Johannes, T., Payen, D. and Ince, C. (2008). Renal hypoxia and dysoxia after

reperfusion of the ischemic kidney. *Molecular medicine*, 14(7-8): 502-516.

Li, J., Hong, Z., Liu, H., Zhou, J., Cui, L., Yuan, S., *et al.* (2016). Hydrogen-rich saline promotes the recovery of renal function after ischemia/reperfusion injury in rats via anti-apoptosis and anti-inflammation. *Frontiers in pharmacology*, 7: 106.

Liu, M., Liang, Y., Chigurupati, S., Lathia, J.D., Pletnikov, M., Sun, Z., *et al.* (2008). Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19(7): 1360.

Liu, Y., Shi, B., Li, Y. and Zhang, H. (2017). Protective effect of luteolin against renal ischemia/reperfusion injury via modulation of pro-inflammatory cytokines, oxidative stress and apoptosis for possible benefit in kidney transplant. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 23: 5720-5727.

Miyazawa, S., Watanabe, H., Miyaji, C., Hotta, O. and Abo, T. (2002). Leukocyte accumulation and changes in extra-renal organs during renal ischemia reperfusion in mice. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(5): 269-278.

Mohajeri, D., Gharamaleki, M.N., Hejazi, S.S. and Nazeri, M. (2013). Preventive effects of turnip (*Brassica rapa L.*) on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Science Journal*, 10(1): 1165-1170.

Mohsen, N., Mahmoud, P., Pejman, S., Mohammed, G., Masoud, S., Ali, T., *et al.* (2010). Effects of stem cells and granulocyte colony stimulating factor in reperfusion injury. *Iranian Journal of Kidney Diseases* 4 (3): 207-13.

Ologunde, R., Zhao, H., Lu, K. and Ma, D. (2014). Organ cross talk and remote organ damage following acute kidney injury. *International urology and nephrology*, 46(12) :2337-2345.

Park, S.W., Chen, S.W., Kim, M., Brown, K.M., Kolls, J.K., D D'Agati, V., *et al.* (2011). Cytokines induce small intestine and liver injury after renal ischemia or nephrectomy. *Laboratory investigation*, 91(1): 63-84.

Patschan, D., Patschan, S. and Müller, G.A. (2012). Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. *Journal of transplantation*, 2012: 1-7.

Quoilin, C., Mouithys-Mickalad, A., Lécart, S., Fontaine-Aupart, M.P. and Hoebeke, M. (2014). Evidence of oxidative stress and mitochondrial respiratory chain dysfunction in an in vitro model of sepsis-induced kidney injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(10): 1790-1800.

Sancaktutar, A.A., Bodakci, M.N., Hatipoglu, N.K., Soylemez, H., Basarılı, K. and Turkcu, G. (2014). The protective effects of pomegranate extracts against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Urology annals*, 6(1): 46.

Scaini, G., Ferreira, G.K. and Streck, E.L. (2010). Mechanisms underlying uremic encephalopathy. *Revista Brasileira de terapia intensiva*, 22: 206-211.

Scheel, P.J., Liu, M. and Rabb, H. (2008). Uremic lung: new insights into a forgotten condition. *Kidney international*, 74(7): 849-851.

Shang, Y., Siow, Y.L. and Isaak, C.K. (2016). Downregulation of glutathione biosynthesis contributes to oxidative stress and liver dysfunction in acute kidney injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-13.

Sung, F.L., Zhu, T.Y., Au-Yeung, K.K., Siow, Y.L. and Karmin, O. (2002). Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF- κ B. *Kidney international*, 62(4): 1160-1170.

Thurman, J.M. (2007). Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical immunology*, 123(1): 7-13.

Wang, P., Zhu, Q., Wu, N., Siow, Y.L., Aukema, H. and O, K. (2013). Tyrosol Attenuates Ischemia–Reperfusion-Induced Kidney Injury via Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(15): 3669-3675.

Yap, S.C., Lee, H.T. and Warner, D.S. (2012). Acute kidney injury and extrarenal organ dysfunction: new concepts and experimental evidence. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 116(5): 1139-1148.

Histopathological study on kidney and heart tissues and apoptosis assessment of cardiac muscle cells following renal time-dependent ischemia reperfusion injury in male rats

Mahbod Bazhban, A.¹, Doustar, Y.^{2*}, Nourazar, M.A.³

- 1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
- 2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
- 3- Assostant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Correspondig author,s email: vetdoustar@gmail.com

Abstract

Kidney ischemia-reperfusion injury (I/R) is one of the most important causes of acute renal failure and subsequent damage to other organs such as the heart. The aim of the present study was to investigate the occurrence of damage and apoptosis in the heart following renal ischemia-reperfusion time-dependent injury in rats. For this purpose, 32 male Wistar rats were randomly divided into 4 equal groups. In the first group (Sham), only the surgical site was opened and closed. In the second group (30-I/R) after the induction of renal ischemia, reperfusion was performed 30 minutes later, in the third group (45-I/R) 45 minutes later, and in the fourth group (60-I/R) 60 minutes later. After 24 hours, all animals were euthanized and their kidney and heart tissues were sampled for microscopic study. Statistical analysis of the data was done by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test, and values of $p < 0.05$ were considered significant. Histopathological findings showed renal damage following I/R in the form of degenerative changes and necrosis of proximal and distal tubules, glomerular and interstitial tissue damage in a time-dependent manner. Also, renal I/R resulted in heart tissue damage including degenerative changes and necrosis along with apoptosis of cardiomyocytes in all groups, but the severity of tissue damage and apoptosis of cardiomyocytes in the 60-I/R group was significantly higher than other groups ($p < 0.05$). The results of the study showed that by reducing the duration of renal ischemia, the damages to the kidney tissue and subsequently heart tissue as well as apoptosis of cardiomyocytes will be less.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Ischemia-Reperfusion, Kidney, Heart, Rat, Apoptosis.