

اثر آزاتیوپرین بر بافت کلیه در موش صحرایی دیابتی

فرنگیس قاسمی^{۱*}، عباس هوشمندی^۲، گلشید احمدی^۳

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۲۵)

چکیده

دیابت مهم‌ترین بیماری متابولیک است که منجر به آسیب کلیوی نیز می‌شود. آزاتیوپرین کاربرد وسیعی در درمان بیماری‌های خود ایمنی و پیوند عضو دارد. به منظور مطالعه تأثیر آزاتیوپرین بر بافت کلیه در موش‌های مقاوم به انسولین، این بررسی انجام گرفت. بدین منظور ۵۶ موش صحرایی (ویستار) با وزن 20 ± 200 g در ۸ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه شاهد که با دریافت روزانه ۱۴۰cc محلول فروکتوز خوراکی دیابتی شدند و گروه‌های تجربی ۱ تا ۴ که علاوه بر دیابتی شدن به ترتیب $3/75$ ، $7/5$ ، 21 و 15 mg/kg/ b.wt آزاتیوپرین در روز ۹۸، به آنها تزریق داخل صفاقی شد. به گروه ۵ و ۶، به ترتیب (۲۱ و ۱۵ mg/kg) آزاتیوپرین به همین ترتیب تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد، کلیه موش‌ها جدا و در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شد. پس از انجام مراحل پاساژ بافتی، اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده مطالعه گردید. داده‌های حاصل با SPSS (۱۶)، ANOVA و دانکن در سطح $p < 0.01$ تحلیل شد. نتایج کاهش معنی‌دار قطر کورتکس و مدولای کلیه در گروه شاهد، گروه‌های تیمار دیابتی و غیر دیابتی و افزایش معنی‌دار در لوله‌های خمیده دور و نزدیک، هنله و گلومرول در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. با توجه به نتایج فوق، آزاتیوپرین با ایجاد اثرات سینرژیک عوارض ناشی از دیابت را تشدید می‌کند لذا بیماران دیابتی، محدودیت مصرف بیشتری در استفاده از این دارو دارند.

کلمات کلیدی: آزاتیوپرین، بافت، مجاری ادراری، گلومرول

^۱ دانشجوی دکتری آناتومی، هیأت علمی گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران ghassemi.fr@gmail.com

^۲ کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران

^۳ دانشکده دندان‌پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، واحد بین‌الملل، شیراز، ایران

مقدمه

بیماری دیابت مهم‌ترین بیماری متابولیک در انسان است که منجر به هیپرگلیسمی و هیپرلیپیدیمی می‌شود. این بیماری به دنبال نقص در تولید انسولین و یا مقاومت به آن به وجود می‌آید. افزایش قند خون می‌تواند منجر به آسیب به چشم، کبد، کلیه، اعصاب و عروق گردد (۱).

در کشورهای در حال توسعه نفروپاتی دیابتی یکی از عمده‌ترین مشکلات پیشرونده و انتهایی کلیوی می‌باشد به طوری که منجر به دیالیز، پیوند کلیه و در نهایت مرگ و میر بیماران می‌شود و از جمله علائم آن افزایش ضخامت غشای پایه‌ی گلوبومول‌ها، افزایش و گسترش بافت بینابینی کلیه افزایش غلظت کراتینین و افزایش اوره سرم است (۴).

آزاتیوپرین یک داروی تضعیف کننده سیستم ایمنی است که جهت درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان خون، لنفوبلاستی حاد، بیماری‌های التهابی روده و روماتیسم مفصلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. آزاتیوپرین به همراه کورتیکواستروئیدها، بهترین انتخاب برای جلوگیری از رد عضو پیوندی می‌باشد (۲). این دارو می‌تواند از سنتز مجدد بازهای پورینی جلوگیری کرده و مانع همانندسازی در سلول‌ها گردد که این عمل به واسطه عدم سنتز DNA و RNA صورت می‌گیرد سمیت ایجاد شده به دنبال استفاده از این دارو در اندام‌هایی از جمله مغز استخوان و کبد و دستگاه گوارشی و پانکراس به اثبات رسیده است که عمده علت آن، تولید رادیکال‌های آزاد در اندام‌های بیمار است (۳). لذا در این مطالعه، اثر آزاتیوپرین بر بافت کلیه در موش‌های آزمایشگاهی مقاوم به انسولین بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن 20 ± 200 gr انتخاب و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵-۵۰ درصد) نگهداری شدند. جهت ایجاد مقاومت به انسولین، موش‌ها به مدت ۹۸ روز تحت تیمار با فروکتوز (۱۰٪) به صورت محلول در آب خوراکی بودند و پس از اطمینان از دیابتی شدن و تست با گلوکومتر، در ۸ گروه مساوی به شرح زیر تقسیم بندی شدند:

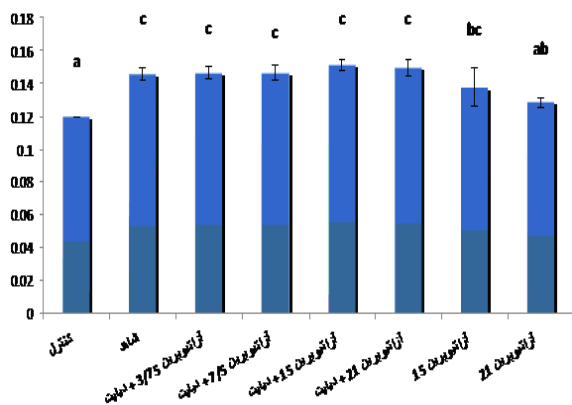
گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه شاهد یا دیابتی (روزانه ۱۴۰ CC محلول فروکتوز (۱۰٪) همراه با آب می‌نوشیدند) و گروه تجربی ۱ تا ۴ یا گروه‌های تیمار دیابتی که پس از دریافت خوراکی محلول فروکتوز (۱۰٪) به مدت ۹۸ روز، به ترتیب $1/5$ ، $3/5$ ، $7/5$ و 21 داروی آزاتیوپرین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه ۵ و ۶ (تیمار غیر دیابتی) در روز ۹۸ بترتیب $1/5$ و 21 آزاتیوپرین به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

۲۴ ساعت پس از تزریق دارو، حیوانات بی‌هوش و کلیه‌ها جدا نموده و در فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد. پس از تثبیت و انجام مراحل پاساژ بافتی شامل تثبیت در فرمالین ۱۰٪، آبگیری، شفاف‌سازی و جای‌گزینی، مقاطع ۵ میکرونی با میکروتوم تهیه و رنگ‌آمیزی (H&E) نموده، سپس اسلایدهای آماده شده با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی $10 \times$ و $40 \times$ بررسی بافتی شد. داده‌های حاصل با آزمون (ANOVA) تحلیل و گروه‌های مورد مطالعه با تست Duncan در سطح معنی‌دار ($P < 0.01$) مقایسه شد.

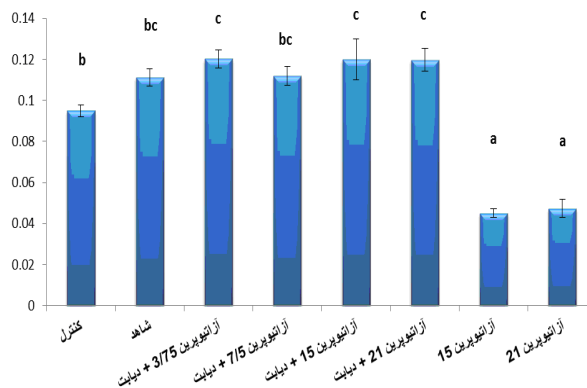
و تغییر قطر قسمت‌های مختلف کلیه گردیده است که به صورت نمودار در زیر آورده شده است.

یافته‌ها

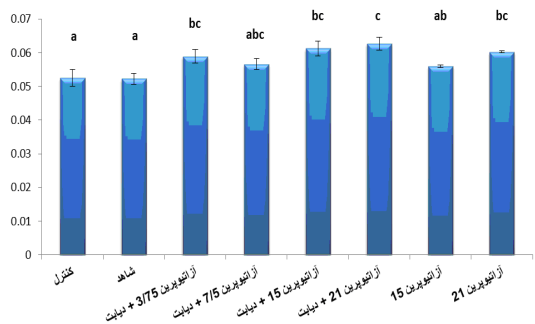
نتایج این تحقیق نشان داد که داروی آزاتیوپرین به طور معنی‌داری باعث تغییرات بافتی



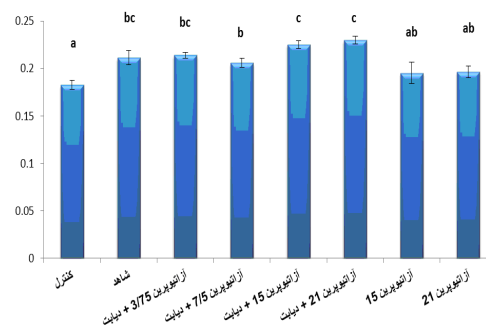
نمودار ۲: مقایسه تغییرات بافتی قطر مدولا



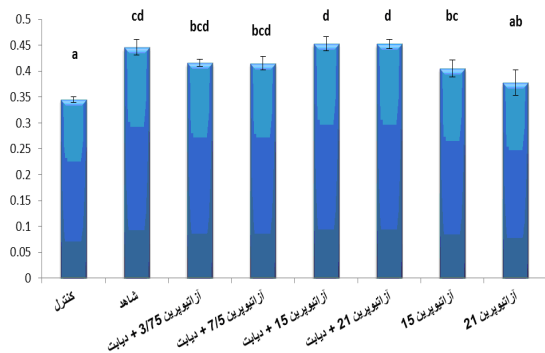
نمودار ۱: مقایسه تغییرات بافتی قطر کورتکس



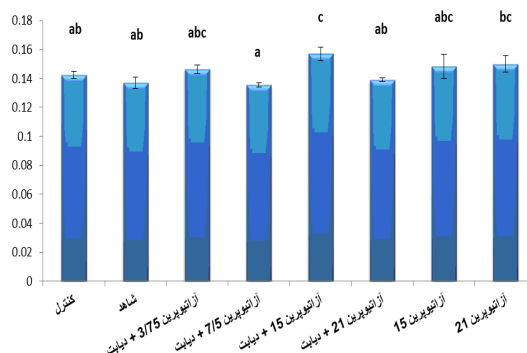
مقدار ۴: مقایسه تغییرات بافتی قطر لوله‌های خمیده دور



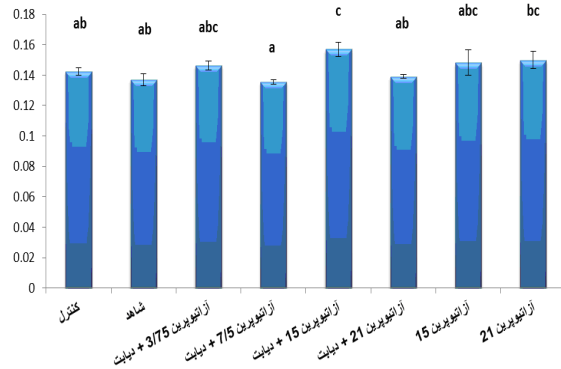
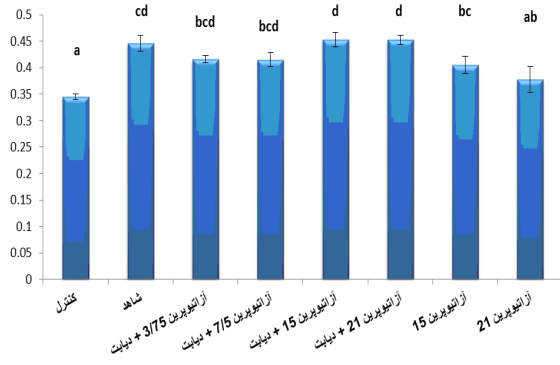
نمودار ۳: مقایسه تغییرات بافتی قطر کپسول بومن



نمودار ۶: مقایسه تغییرات بافتی قطر لوله هنله



نمودار ۵: تغییرات بافتی قطر لوله‌های خمیده نزدیک



نمودار ۷: مقایسه تغییرات بافتی قطر لوله‌های جمع‌کننده ادرار
نمودار ۸: مقایسه تغییرات بافتی قطر گلومرول در گروه‌های مورد بررسی

در اثر دیابت قطر گلومرول‌ها زیاد می‌شود و در فیلتر خون اشکال ایجاد می‌کند. آزاتیوپرین هم با ازدیاد سلول‌های اندوتلیال گلومرول، افزایش قطر گلومرول و لوله‌های خمیده را باعث می‌شود لذا با واکوئل شدن سلول‌های اندوتلیالی کم شدن ضخامت بافت اندوتلیال لوله‌های ادراری مشاهده می‌گردد (۷).

ممکن است در اثر ورود دارو به داخل بافت کلیه، نوتروفیل شروع به تورم کرده و همچنین، تعداد فوق‌العاده زیادی از لیزوزوم در سیتوپلاسم وجود می‌آیند و به آن ظاهر یک کیسه مملو از گرانول را می‌بخشند. نوتروفیلها با تهاجم به داخل ناحیه ملتهب سطح داخلی آندوتلیوم مویرگ‌ها را تغییر داده و با ایجاد منافذی در جدار مویرگ‌ها، وارد فضای میان بافتی می‌شوند. حرکت نوتروفیلها و مارکوفازها به این محل ایجاد التهاب نموده و واکنش‌های التهابی از طریق رها کردن واسطه‌های التهابی از جمله کینین، پروستاگلاندین، لکوترین و همچنین سیتوکینها (Cytokine) مثل اینترلوکین باعث نکروز شدن بافت شوند (۹). در نتیجه ضخامت دیواره لوله‌ها کمتر و قطر داخلی آنها افزایش می‌یابد. التهاب باعث ارتشاح سلول‌های بافتی به داخل الوتول و فضای بین بافتی شده و متعاقب آن، این سلول‌ها با آزاد کردن پروتئازها و

بحث

بیماری دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون ریز است که به دنبال این بیماری اعمال متابولیک بدن دچار اختلال می‌گردد و با ایجاد هیپرگلیسمی، بیشتر سلول‌ها قادر به استفاده از گلوکز برای تغذیه نیستند. شواهد بدست آمده نشان می‌دهد افزایش قند خون یک فاکتور مهم برای ایجاد آسیب کلیوی می‌باشد (۴)

نتایج حاکی از آن است که ضخامت کورتکس و مدولا در گروه شاهد و همه گروه‌های تیمار کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) داشته است و قطر گلومرول، کپسول بومن، لوله‌های خمیده دور و نزدیک و لوله هنله نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری داشته است. به نظر می‌رسد که در ضخامت لوله جمع‌کننده ادرار تغییر معنی‌داری رخ نداده است.

حدود ۲٪ از آزاتیوپرین و متابولیت حاصل از آن یعنی ۶- مرکاپتوپورین به صورت دست نخورده از ادرار دفع می‌شود و مقدار بیشتر دارو نیز به صورت متابولیت‌های ثانویه دارو از راه کلیه‌ها دفع می‌گردند (۳). به همین دلیل انتظار می‌رود که این دارو که امروزه در درمان بعضی بیماری‌های حاد بکار می‌رود روی کلیه اثرات جانبی داشته باشد.

که گرچه هر دو عامل (دیابت و داروی مصرفی) در نتیجه مؤثر بوده‌اند (۱۲ و ۳۲) ولی در گروه‌های تیمار دیابتی شدت اثر بیشتر بوده است. پس این دارو با اثر سینرژیک، عوارض ناشی از دیابت را شدت بخشیده است که با نتایج تحقیقات دیگران بر بیماری دیابت مطابقت دارد (۶ و ۷).

مسمومیت حاصل از داروها نه فقط به ماهیت شیمیایی دارو، بلکه به فاکتورهایی از فرد بیمار نیز بستگی دارد. برخی بیماری‌ها بر جذب، توزیع، متابولیسم و دفع مواد اثر می‌گذارد (۱۲). این بیماری‌ها می‌توانند سمیت مربوط به دارو را تغییر دهند که خود منجر به بحران‌های سلامت مرتبط با مصرف دارو می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با استناد به نتایج فوق، گرچه آسیب بافتی حاصل از مصرف داروی آزاتیوپرین با دوز مصرفی در این تحقیق، چندان شدید نبوده اما به واسطه اثر سینرژیک با دیابت باعث تشدید آسیب‌های وارده می‌شود. بنابراین مصرف دارو در بیماران دیابتی محدودیت دارد.

رادیکال آزاد باعث آسیب به سلول‌های پارانسیم و حتی مرگ سلولی (نکروز و آپتوپوز) می‌شوند (۸).

در افراد دیابتی و در آسیب‌های کلیوی، کورتکس خشن و نامنظم شده و بافت جوشگاه در گلودرول‌ها و لوله‌های ادراری تشکیل می‌شود و شاخه‌های شریان کلیوی ضخیم می‌گردد (۱۳). در فیلتراسیون یون‌ها اشکال ایجاد می‌شود که نتیجه این فرایند، آسیب شدید گلودرولی (نمودار ۸) است. اکثر داروها با واکنش‌های اکسیداتیو همراه بوده و با تغییر نفوذپذیری غشای سلول‌ها تعادل یونی را بهم‌زده و احتمالاً آزاتیوپرین هم با همین مکانسیم عمل می‌کند (۳).

به نظر می‌رسد (همه نمودارها) اثرات سمی آزاتیوپرین تابع دوز مصرفی و شدت واکنش و مدت تیمار است. معمولاً یک ماه تا دو ماه طول می‌کشد تا اثرات آزاتیوپرین مشاهده شود که احتمالاً در این مدت سنتر و متابولیسم پورین مختل می‌شود (۲ و ۱۱). مدت زمان این تحقیق (۹۸ روز) فرصت لازم برای اعمال اثر را ایجاد نموده است. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار دیابتی و غیر دیابتی در اکثر نمودارها از یک طرف و اختلاف معنی‌دار هر دو با گروه کنترل از طرف دیگر مؤید این مطلب است

Reference

- 1-Ahmad, MS, Ahmed, N, 2006. Antiglycation properties of aged garlic extract possible role in prevention of diabetic complications. *Journal of Nutrition*, 796-799.
- 2-Amin, A, Hamza, AA, 2005 . Hepatoprotective effects of Hibiscus, Rosmarinus and Salvia on azathioprine induced toxicity in rats. *Life Science*, 77(3): 266-78.
- 3-Amouoghli Tabrizi, B, Mohajeri, D, Doostar, Y, Baradaran Alizade, et al., 2009. Biochemical and pathological study of protective effect of Vitamin A in Azathioprine-induced hepatotoxicity in Rat, Feyz, *Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 13: 180-187.
- 4-Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karlberg B, Madsbad S, Jervell J, Mustonen J 2004. Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril Study Group: Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 351: 1952-1961.
- 5- David, M, 1993. Long-term complications of diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, 328:1676-1685.

- 6- Hayashi, T, Nozawa, M, Sohmiya, K, Toko, H, Nakao, M, et al., 1998. Efficacy of pancreatic transplantation on cardiovascular alterations in diabetic rats: an Itrastructural and immunohistochemical study. *Transplant Protocol*, 30: 335-8.
- 7-Kaneto, H, Katakami, N, Kawamori, D, et al., 2007. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9 (3): 355-66.
- 8-Rainer, L, Schleicher, ED, 2000. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimical Acta*, 297:135-44.
- 9- Remuzzi G, Ruggenti P, Perna A, Dimitrov BD, de Zeeuw D, Hille DA, et al. 2004. Continuum of renoprotection with losartan at all stages of type 2 diabetic nephropathy: A post hoc analysis of the RENAAL trial results. *J Am Soc Nephrol* **15** :3117 -3125.
- 10-Sundby, GB, Ormstad, K, Orrenius, S, 1979. Use of isolated kidney cells for study of drug metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 28:929-935.
- 11-Tapner, M, Jones, B, Farrel, G, 2004. Toxicity of low dose azathioprine and 6-mercaptopurine in rat hepatocytes. Roles of xanthine oxidase and mitochondrial injury, *Journal of Hepatology*, 40(3): 454-463.
- 12-Tripathi BK, and Srivastava AK (2006) Diabetes mellitus: complications and herapeutics. *Med Sci Monit*, , 12: 130-147.
- 13-Wu, YG, Lin, H, Qi, XM, Wu, GZ, et al., 2006. Prevention of early renal injury by mycophenolate mofetil and its mechanism in experimental diabetes. *International Immunopharmacology*, 445-53.