

مطالعه استریولوژیکی اثر ویتامین E بر بافت کلیه رت پس از تیمار با پارا نونایل فنل

ملک سلیمانی مهرنجانی Ph.D.^{*}، زینب توکلیان M.Sc.^۲

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، کدپستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹
 ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-soleimani@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۳۱

چکیده

هدف: پارا نونایل فنل یک آلاینده زیست محیطی است که با توان تولید رادیکال آزاد می تواند موجب تخریب بافت شود. هدف این مطالعه بررسی اثر ویتامین E به عنوان یک آنتی آکسیدانت قوی بر بافت کلیه در رت های تیمار شده با پارا نونایل فنل با استفاده از تکنیک استریولوژی بود.

مواد و روش ها: برای انجام این آزمایش تعداد ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین وزنی 198 ± 20 گرم به طور تصادفی به ۴ گروه ($n=6$) کنترل، ویتامین E (100 mg/kg/day)، پارا نونایل فنل (250 mg/kg/day) و پارا نونایل فنل + ویتامین E تقسیم شد. پس از ۵۶ روز تیمار دهانی با گاوژ وزن رت ها تعیین، کلیه راست خارج و فیکس شد. پس از انجام برش گیری، پاساژ بافتی و رنگ آمیزی هایدن هاین آزان، مقاطع بافت کلیه مورد ارزیابی استریولوژیک قرار گرفت. داده ها با روش آنالیز واریانس یکطرفه تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج: در این پژوهش میانگین وزن کلیه، حجم کل کلیه، حجم کورتکس و مدولا، حجم لومن لوله های دور و نزدیک، حجم بافت بینابینی، حجم گومرولوس و تافت در گروه پارا نونایل فنل نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان داد. کاهش معنی داری در حجم اپی تلیوم لوله های دور و نزدیک و همچنین فضای بومن در گروه پارا نونایل فنل نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید.

نتیجه گیری: ویتامین E توانست بسیاری از اثرات نامطلوب پارا نونایل فنل بر بافت کلیه را جبران کند. بنابراین می توان از ویتامین E به عنوان یک مکمل در مسمومیت های ناشی از پارا نونایل فنل استفاده کرد.

واژگان کلیدی: کلیه، پارا نونایل فنل، ویتامین E، استریولوژی، رت

مقدمه

آلکیل فنل‌ها گروه کوچکی از دسته موادی است که به عنوان مواد تقلیدکننده عمل هورمونی شناخته شده و دارای خاصیت استروژنی ضعیفی می‌باشند (۱). این مواد همچنین دارای اثرات سمی و استروژنی هستند و تحت پروسه تخریب، مشتقاتی با زنجیره کوتاه، مانند نونایل فنل را تولید می‌کنند (۲). در نتیجه این واکنش، از خاصیت هیدروفیلیک آلکیل فنول‌ها کاسته شده و نونایل فنل دارای خاصیت لیپوفیلیک می‌شود. به علت خصوصیات فیزیکی شیمیایی نونایل فنل، مثلاً قابلیت انحلال پایین و هیدروفوبیک بالا این ماده در رسوبات رودخانه‌ها و فاضلاب تجمع می‌یابد و موجب آلوده شدن محیط زیست می‌شود (۳). این آلاینده سال‌ها است که در صنعت برای تولید دترجنت‌ها، امولسیون کننده‌ها، آفت کش‌ها، رنگ‌ها، وسایل آرایشی، حشره کش‌ها، اجناس پلاستیکی و اسپرم کش‌ها کاربرد دارد (۲ و ۴). این ماده نه تنها از طریق غذا و آب آلوده بلکه از طریق پوست و استنشاق نیز می‌تواند جذب شود (۵). نونایل فنل باعث تولید ROS (Reactive Oxygen Species)، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و در نهایت باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود (۲).

نونایل فنل در اندام‌های مختلف آسیب‌های متفاوتی را ایجاد می‌کند. به دلیل اینکه نونایل فنل و مشتقات آن از طریق کلیه دفع می‌شوند کلیه جز مهم‌ترین اندام هدف برای سمیت نونایل فنل است (۶) و در حضور این آلاینده زیست محیطی، این اندام دچار آسیب‌های ساختاری و فیزیولوژیک شده که به نوبه خود منجر به افزایش وزن، ایجاد پلی کیستی در کلیه و به دنبال آن هیدرونفروزیز و تجمع مایعات در لوله‌های کلیوی می‌باشد (۷ و ۸). همچنین نونایل فنل موجب کاهش فیلتراسیون گلومرولی شده و از طریق آسیب‌هایی که به لوله‌های کلیوی وارد می‌کند باز جذب آب را کاهش داده و باعث افزایش حجم ادرار و کاهش کراتینین در ادرار می‌شود (۶). نکرور سلولی، اتساع و آماس لوله‌های کلیوی و تخریب حاشیه مسواکی لوله‌های نزدیک از جمله تغییرات هیستوپاتولوژیکی کلیه در حضور نونایل فنل می‌باشند (۹).

ویتامین E یکی از عوامل پاک سازی سلول از رادیکال‌های آزاد می‌باشد که باعث حفاظت ارگانسیم‌ها در برابر عوامل سمی و آسیب‌های رادیکال‌های آزاد می‌شود و به عنوان یک Scavenger

برای جذب رادیکال‌های آزاد و کاهش ROS عمل می‌کند (۱۰). ویتامین E باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در بافت کلیه می‌شود (۱۱). هدف از این پژوهش، بررسی اثر ویتامین E بعنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی در کاهش و جبران اثرات نامطلوب پارانونایل فنل بر بافت کلیه رت با استفاده از روش‌های استریولوژیک بود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مطالعه تجربی ۲۴ سر رت نر بالغ از نژاد ویستار با میانگین وزنی 20 ± 198 گرم از انیستیتو پاستور ایران خریداری شد و در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد (دمای 21 ± 2 درجه سانتی‌گراد و نور با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری و برای ادامه مطالعه بر روی آن‌ها کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. رت‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه ($n=6$): کنترل، تیمار با پارا نونایل فنل (250 mg/kg/day) (۹)، تیمار با ویتامین E (100 Emg/kg/day) (۱۲) و پارا نونایل فنل + ویتامین E تقسیم شد. تیمار دهانی به مدت ۵۶ روز و با استفاده از گاواژ انجام گرفت. در پایان دوره تیمار ابتدا رت‌ها توسط دی اتیل اتر بیهوش و بعد از تشریح، کلیه راست آن‌ها خارج و پس از وزن کردن و تعیین حجم به روش Immersion (۱۳) در فیکساتیو بوئن فیکس شده و با استفاده از روش orientator برش‌های IUR تهیه شد (۱۴ و ۱۵). پس از انجام مراحل پاساژ بافتی و تهیه بلوک پارافینی، با استفاده از میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی تهیه و به روش هایدن هان آزان رنگ آمیزی شد. به منظور محاسبه میزان چروکیدگی با استفاده از تروکار از سه برش ایجاد شده به روش IUR، سه قطعه تهیه و در هر یک دو قطر عمود برهم اندازه گیری و سپس میانگین شعاع آنها محاسبه و به عنوان rbefore در نظر گرفته شد. بعد از مراحل پاساژ بافتی و رنگ آمیزی، مجدداً دو قطر عمود بر هم در سه قطعه مذکور، اندازه گیری و میانگین شعاع آن‌ها به صورت rafter محاسبه شد. آنگاه با استفاده از فرمول زیر میزان چروکیدگی بافت محاسبه گردید (۱۴).

$$\text{shrinkage} = 1 - \left(\frac{r_{\text{after}}^2}{r_{\text{before}}^2} \right)^{\frac{3}{2}}$$

با استفاده از فرمول Shrinkage-1، حجم نهائی محاسبه و سپس با ضرب آن در حجمی که به روش Immersion به دست آمده بود حجم واقعی کلیه تعیین گردید.

برای محاسبه حجم کورتکس و حجم مدولا با استفاده از روش نمونه گیری تصادفی منظم بطور میانگین ۱۵ میدان دید از هر اسلاید ۵ میکرونی با قراردادن پروب نقطه‌ای روی هر فیلد مورد بررسی قرار گرفت. کل نقاط برخورد کرده از پروب با کل میدان دید انتخاب شده با $\sum_{i=1}^n P_{total}$ ، نقاط برخورد کرده با کورتکس

$$V_{vx} = \frac{\sum_{i=1}^n P(x)}{\sum_{i=1}^n P_{total}}$$

سپس با استفاده از فرمول زیر حجم لوله‌ها، لومن و اپی‌تلیوم آن‌ها، بافت بینابینی و یا گلومرولوس به طور جداگانه از طریق ضرب کردن دانسیته حجمی هر کدام در حجم کورتکس محاسبه شد:

$$v_x = v_{cortex} \times v_{vx}$$

در فرمول فوق X می‌تواند نشان دهنده لوله‌ها، لومن و اپی‌تلیوم آن‌ها، بافت بینابینی و گلومرولوس باشد.

برای محاسبه حجم اجزای گلومرولوس نقاط برخورد کرده با این اجزاء با $\sum_{i=1}^n P_x$ و نقاط برخورد کرده با گلومرولوس با

$\sum_{i=1}^n P_{glomerulus}$ نشان داده شد و دانسیته حجمی

گلومرولوس با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید. X نشان دهنده هر کدام از اجزا گلومرولوس یعنی تافت، کاپیلاری، کپسول بومن و فضای بومن است.

$$V_{vx} = \frac{\sum_{i=1}^n P(x)}{\sum_{i=1}^n P_{glomerulus}}$$

سپس حجم تافت، کاپیلاری، کپسول بومن و فضای بومن نیز از طریق ضرب کردن دانسیته حجمی هر کدام از اجزا در حجم گلومرولوس به شکل زیر محاسبه شد:

$$v_x = v_{glomerulus} \times v_{vx}$$

که در آن X می‌تواند نشان دهنده هر کدام از اجزا گلومرولوس یعنی تافت، کاپیلاری، کپسول بومن و فضای بومن باشد (۱۸).

محاسبه طول لوله‌های نزدیک و دور: برای محاسبه طول لوله‌های نزدیک و دور نیز بطور تصادفی تعداد ۱۵ تا ۲۰ میدان

دید انتخاب شده با $\sum_{i=1}^n P_{total}$ ، نقاط برخورد کرده با کورتکس

با $\sum_{i=1}^n P_{cortex}$ و نقاط برخورد کرده با مدولا با $\sum_{i=1}^n P_{medulla}$ نشان داده شد. دانسیته حجمی با استفاده از فرمول‌های زیر برای کورتکس و مدولا محاسبه گردید (۱۶).

$$V_{v \text{ cortex}} = \frac{\sum_{i=1}^n P_{cortex}}{\sum_{i=1}^n P_{total}}$$

$$V_{v \text{ medolla}} = \frac{\sum_{i=1}^n P_{medulla}}{\sum_{i=1}^n P_{total}}$$

سپس حجم کورتکس و مدولا به طور جداگانه از طریق ضرب کردن دانسیته حجمی هر یک در حجم کل کلیه در هر رت محاسبه شد.

$$V_{v \text{ medulla}} \times V_{total} = V_{medulla} \quad \text{و}$$

$$V_{v \text{ cortex}} \times V_{total} = V_{cortex}$$

برای محاسبه حجم اجزای کورتکس (لوله‌های نزدیک و دور به همراه لومن و اپی‌تلیوم آن‌ها، گلومرولوس و بافت بینابینی) نیز با استفاده از روش نمونه گیری تصادفی منظم بطور میانگین ۱۵ میدان دید از هر اسلاید ۵ میکرونی با قراردادن پروب نقطه‌ای روی هر فیلد مورد بررسی قرار گرفت. کل نقاط برخورد کرده از پروب با کل میدان دید انتخاب شده با $\sum_{i=1}^n P_{total}$ و نقاط

دید از برشهای ۵ میکرونی بافت کلیه باعدسی ۴۰ و روش تصادفی منظم انتخاب شد و با استفاده از فرمول زیر طول لوله‌های دور و نزدیک محاسبه گردید:

$$L_V = 2 \times \frac{\sum_{i=1}^n Q_i}{\frac{a}{f} \sum_{i=1}^n P_i}$$

که در آن $\sum Q_i$ مجموع لوله‌های انتخاب شده، $\frac{a}{f}$ سطح فریم مورد نظر در مقیاس بافت و مجموع $\sum P_i$ نقاط برخوردکننده با بافت کلیه می‌باشد. برای محاسبه طول مطلق لوله‌ها، با استفاده از فرمول زیردانشیته طولی در حجم نهائی کلیه ضرب شد (۱۵۱۴):

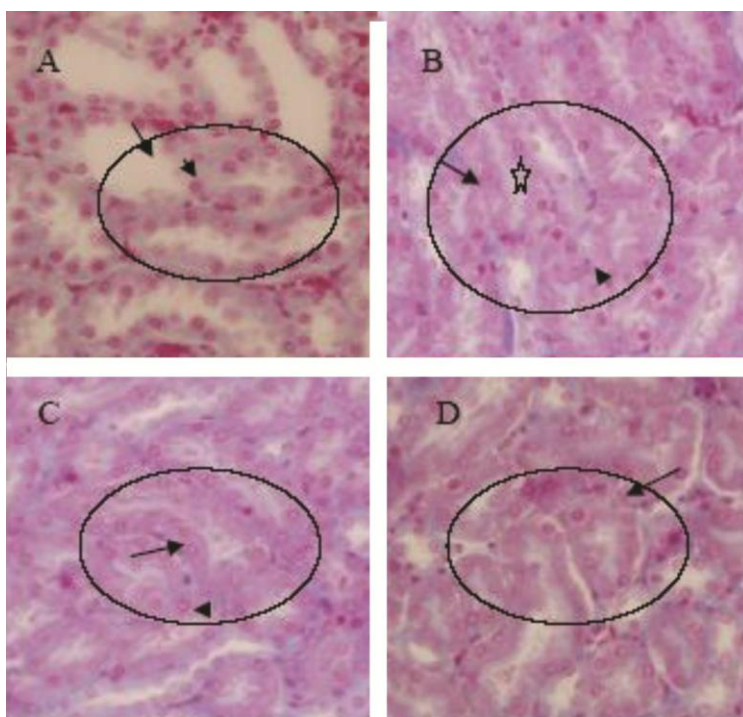
$$L_{VP} = L_{V_V} \times V_{kidney}$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های بدست آمده توسط نرم افزار Spss16 و روش آنالیز واریانس یک طرفه (Oneway

نتایج

تغییرات هیستوپاتولوژیک کلیه

ساختمان طبیعی بافت کلیه به همراه لوله‌ها و اپی‌تلیوم‌های منظم و مستقر بر روی غشاء پایه، فضای لومن و همچنین گلوبول‌های طبیعی در گروه‌های کنترل (شکل‌های ۱ و ۲، A) و ویتامین E (شکل‌های ۱ و ۲، D) مشاهده شد. اما در گروه تیمار با پارا نونایل فنل لومن لوله‌ها متسع و اپی‌تلیوم آن‌ها دچار نکروز شد، علاوه بر این حاشیه مسواکی لوله‌های نزدیک تخریب و گلوبول‌ها دچار هایپرتروفی گردید (شکل‌های ۱ و ۲، B). سلول‌های تقریباً طبیعی همراه با حاشیه مسواکی و لومن مشخص، همچنین گلوبولوس شبیه به گروه کنترل در گروه پارا نونایل فنل + ویتامین E دیده شد (شکل‌های ۱ و ۲، C).

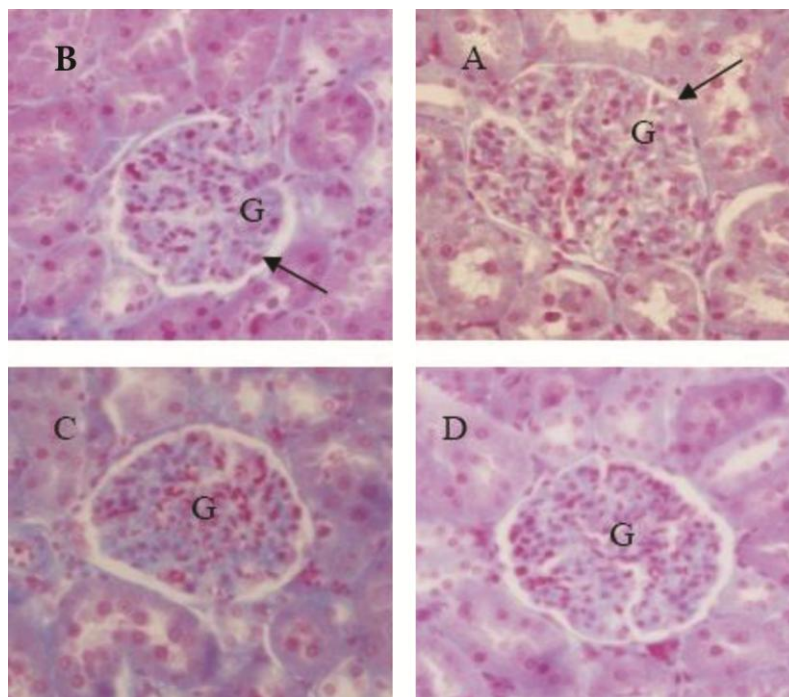


شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی از بافت کلیه رت‌های نر بالغ تیمار شده با پارا نونایل فنل و ویتامین E (برش‌های ۵ میکرونی، رنگ آمیزی هایدن-هاین آزان، بزرگنمایی $\times 400$) نشان دهنده تغییرات هیستوپاتولوژیک لوله‌های کلیوی:

(A) لوله‌های کلیوی با آرایش منظم سلول‌های اپی‌تلیومی همراه با حاشیه مسواکی (پیکان) و فضای لومن مشخص (نوک پیکان) در گروه کنترل (B) لوله‌های کلیوی با سلول‌های اپی‌تلیومی آتروفی شده و تخریب حاشیه مسواکی (پیکان و نوک پیکان) همراه با اتساع لومن (ستاره) در گروه تیمار با پارا نونایل فنل

(C) لوله‌های کلیوی با سلول‌های اپی‌تلیومی تقریباً طبیعی (پیکان) و فضای لومن مشخص به همراه حاشیه مسواکی (نوک پیکان) در گروه تیمار با پارا نونایل فنل + ویتامین E

(D) بافت و لوله‌های طبیعی کلیه (پیکان) با ظاهری شبیه به گروه کنترل در گروه تیمار با ویتامین E



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپی از بافت کلیه رت‌های نر بالغ تیمار شده با پارا نونایل فنل و ویتامین E (برش‌های ۵ میکرونی، رنگ آمیزی هایدن- هاین از آن، گلومرولوس = G، بزرگنمایی $\times 400$) نشان دهنده تغییرات هیستوپاتولوژیک ایجاد شده در ساختمان گلومرولوس: (A) گلومرولوس با اجزا و ساختار و اندازه طبیعی (نوک پیکان نشان دهنده فضای بومن) در گروه کنترل (B) گلومرولوس دچار هایپرتروفی و کاهش فضای بومن (نوک پیکان) در گروه تیمار با پارا نونایل فنل (C) گلومرولوس با ظاهری شبیه گروه کنترل در گروه پارا نونایل فنل + ویتامین E (D) گلومرولوس با ظاهری طبیعی و شبیه گروه کنترل در گروه تیمار با ویتامین E

حجم کل کلیه، حجم کورتکس و مدولا

میانگین حجم کل کلیه در پایان دوره تیمار در گروه پارا نونایل فنل در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری ($P < 0/02$) را نشان داد (جدول ۱). افزایش معنی‌دار حجم کورتکس و مدولا ($P < 0/04$) در گروه پارا نونایل فنل نسبت به گروه‌های کنترل، ویتامین E و پارا نونایل فنل + ویتامین E مشاهده شد (جدول ۱). میانگین حجم لوله‌های نزدیک و دور در گروه‌های مختلف رت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$). حجم اپی‌تلیوم لوله‌های نزدیک و دور در گروه پارا نونایل فنل نسبت به گروه‌های کنترل و گروه ویتامین E کاهش معنی‌داری ($P < 0/02$) را نشان داد، اما نسبت به گروه پارا نونایل فنل + ویتامین E معنی‌دار نبود ($P > 0/05$). حجم لومن لوله‌های نزدیک و دور در گروه پارا نونایل فنل نسبت به هر سه گروه کنترل، ویتامین E و پارا نونایل فنل + ویتامین E افزایش معنی‌داری ($P < 0/001$) را نشان داد (جدول ۲).

حجم گلومرولوس در گروه پارانونایل فنل نسبت به گروه‌های کنترل و ویتامین E افزایش معنی‌داری ($P < 0/01$) و نسبت به

گروه پارا نونایل فنل + ویتامین E افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان داد (جدول ۳). حجم تافت در گروه پارا نونایل فنل نسبت به هر سه گروه افزایش معنی‌داری ($P < 0/001$) را نشان داد (جدول ۳).

حجم کاپیلاری و کپسول بومن در بین گروه‌های مختلف رت اختلاف معنی‌داری ($P > 0/05$) را نشان نداد، اما میانگین حجم فضای بومن در گروه پارانونایل فنل نسبت به دیگر گروه‌ها کاهش معنی‌داری ($P < 0/01$) را نشان داد (جدول ۳). همچنین افزایش معنی‌داری در حجم بافت بینابینی در گروه پارا نونایل فنل نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد ($P < 0/01$).

میانگین طول لوله‌های نزدیک و دور در بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری ($P > 0/05$) را نشان نداد (جدول ۲).

از مقایسه میانگین وزن رت پس از اتمام دوره تیمار در بین گروه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0/05$). علاوه بر آن میانگین وزن کلیه در پایان دوره تیمار در گروه پارا نونایل فنل در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری ($P < 0/002$) را نشان داد (جدول ۴).

جدول ۱: مقایسه میانگین حجم کل کلیه، حجم کورتکس، مدولا و حجم بافت بینابینی (میلی متر مکعب) در گروه‌های مختلف رت نر بالغ پس از ۸ هفته تیمار با پارا نونایل فنل (۲۵۰ mg/kg/day) و ویتامین E (۱۰۰ mg/kg/day). مقادیر بصورت $means \pm sd$ می باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). ANOVA, Tukey's test.

گروه ها	حجم کل کلیه	حجم کورتکس	حجم مدولا	حجم بافت بینابینی
کنترل	۶۷۸±۵۴ ^a	۵۱۰±۴۱ ^a	۱۶۷±۲۶ ^a	۵۰±۹ ^a
ویتامین E	۶۶۷±۴۹ ^a	۵۰۲±۴۰ ^a	۱۶۴±۳۰ ^a	۵۲±۴ ^a
پارا نونایل فنل	۷۹۶±۶۲ ^b	۵۶۸±۲۲ ^b	۲۲۸±۵۷ ^b	۷۰±۴ ^b
پارا نونایل فنل + ویتامین E	۶۷۴±۱۸ ^a	۵۰۸±۲۱ ^a	۱۶۵±۲۳ ^a	۵۹±۵ ^a

جدول ۲: مقایسه میانگین حجم لوله‌های نزدیک و دور، حجم لومن و اپی تلیوم (میلی متر مکعب) و طول آن‌ها (متر) در گروه‌های مختلف رت نر بالغ پس از ۸ هفته تیمار با پارا نونایل فنل (۲۵۰ mg/kg/day) و ویتامین E (۱۰۰ mg/kg/day). مقادیر بصورت $means \pm sd$ می باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). ANOVA, Tukey's test.

گروه ها	حجم لوله نزدیک (mm ³)			حجم لوله دور (mm ³)			طول لوله‌ها (m)	
	حجم کل	حجم اپی تلیوم	حجم لومن	حجم کل	حجم اپی تلیوم	حجم لومن	لوله نزدیک	لوله دور
کنترل	۳۵۷±۴۱ ^a	۲۷۵±۳۱ ^a	۸۲±۱۳ ^a	۷۹±۱۵ ^a	۵۸±۱۲ ^a	۵±۲ ^a	۳۸۱±۵۴ ^a	۱۷۸±۱۳ ^a
ویتامین E	۳۴۶±۳۷ ^a	۲۷۶±۳۲ ^a	۷۰±۸ ^a	۸۱±۴ ^a	۵۷±۲ ^a	۲۳±۲ ^a	۳۲۰±۴۱ ^a	۱۷۸±۳۴ ^a
پارا نونایل فنل	۳۷۵±۲۰ ^a	۲۳۱±۱۱ ^b	۱۴۴±۲۳ ^b	۹۴±۱۳ ^a	۳۹±۹ ^b	۵۴±۹ ^b	۳۳۹±۲۹ ^a	۱۸۸±۲۳ ^a
پارا نونایل فنل + ویتامین E	۳۴۵±۱۹ ^a	۲۵۹±۱۶ ^{a,b}	۸۶±۱۴ ^a	۷۹±۱۴ ^a	۴۹±۱۱ ^{a,b}	۳۰±۷ ^a	۳۴۹±۲۱ ^a	۱۷۰±۲۰ ^a

جدول ۳: مقایسه میانگین حجم گلوپروپوس، حجم تافت، حجم کاپیلاری، حجم کیپسول بومن و حجم فضای بومن (میلی متر مکعب) در گروه‌های مختلف رت نر بالغ پس از ۸ هفته تیمار با پارا نونایل فنل (۲۵۰ mg/kg/day) و ویتامین E (۱۰۰ mg/kg/day). مقادیر بصورت $means \pm sd$ می باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). ANOVA, Tukey's test.

گروه‌ها	حجم گلوپروپوس	حجم تافت	حجم کاپیلاری	حجم کیپسول بومن	حجم فضای بومن
کنترل	۲۳±۱ ^a	۱۲±۰/۴ ^a	۴±۱ ^a	۲±۰/۲ ^a	۳±۰/۷ ^a
ویتامین E	۲۲±۲ ^a	۱۲±۱ ^a	۴±۰/۵ ^a	۲±۰/۶ ^a	۳±۰/۴ ^a
پارا نونایل فنل	۲۷±۲ ^b	۱۷±۱ ^b	۴±۰/۵ ^a	۳±۰/۹ ^a	۱±۰/۲ ^b
پارا نونایل فنل + ویتامین E	۲۴±۱ ^a	۱۲±۱ ^a	۴±۰/۷ ^a	۳±۰/۵ ^a	۲±۰/۳ ^a

جدول ۴: مقایسه میانگین وزن رت و وزن کلیه (گرم) در گروه‌های مختلف رت نر بالغ پس از ۸ هفته تیمار با پارا نونایل فنل (۲۵۰ mg/kg/day) و ویتامین E (۱۰۰ mg/kg/day). مقادیر بصورت $means \pm sd$ می باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت، دارای تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$). ANOVA, Tukey's test.

گروه‌ها	میانگین وزن رت قبل از شروع تیمار (گرم)	میانگین وزن رت در پایان تیمار (گرم)	میانگین وزن کلیه رت (گرم)
کنترل	۱۹۵±۱۰ ^a	۲۸۲±۲۰ ^a	۰/۹۳±۰/۰۸ ^a
ویتامین E	۱۹۸±۱۴ ^a	۳۱۳±۳۰ ^a	۰/۹۰±۰/۰۴ ^a
پارا نونایل فنل	۲۰۵±۱۷ ^a	۲۸۷±۲۸ ^a	۰/۱۱۲±۰/۰۸ ^b
پارا نونایل فنل + ویتامین E	۱۹۷±۱۶ ^a	۲۸۹±۲۰ ^a	۰/۹۵±۰/۰۱ ^a

بحث

اپی تلیال در لوله‌های کلیوی می‌باشد. مشخص شده است که در رت‌هایی که نونایل فنل را دریافت می‌کنند سلول‌های اپی تلیال در لوله‌های کلیوی نزدیک، دور و جمع کننده دچار نکروز می‌شوند (۹). علاوه بر این برخی مطالعات نشان داده است که COX-1 آنزیمی است که در تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین نقش مهمی را ایفا می‌کند و پروستاگلاندین از نکروز لوله‌های کلیوی جلوگیری می‌کند. این در حالی است که نونایل فنل می‌تواند به طور انتخابی فعالیت COX-1 را مهار کند در این صورت می‌توان نتیجه گرفت که نونایل فنل از طریق مهار تولید پروستاگلاندین، به طور غیر مستقیم باعث نکروز لوله‌های کلیوی می‌شود (۲۲).

در مطالعات دیگر مشخص شده است که نونایل فنل می‌تواند باعث ایجاد خونریزی در بین لوله‌های کلیوی شود (۲۳) و این می‌تواند یکی از علل افزایش حجم در بافت بینابینی کلیه باشد. از آنجایی که نونایل فنل باعث تولید ROS و رادیکال‌های آزاد شود، می‌تواند باعث التهاب و افزایش حجم در بافت بینابینی کلیه گردد (۲۴).

در این مطالعه افزایش حجم گلومرول‌ها در گروه تیمار با پارانونایل فنل نیز مشاهده شد که می‌تواند به منظور جبران عملکرد گلومرول‌های از دست رفته باشد و از سوی دیگر به منظور تطابق با شرایط جدید و دفع مواد سمی از بدن صورت گرفته باشد. پلی کیستی می‌تواند منجر به کاهش فیلتراسیون گلومرولی شود (۲۵) و گلومرول‌ها برای کنترل شرایط و حفظ فیلتراسیون دچار هیپرفیلتراسیون می‌شوند و این امر منجر به افزایش حجم گلومرول‌ها می‌گردد (۲۶). این پژوهش نشان داد که پارانونایل فنل باعث افزایش حجم تافت می‌شود و افزایش در حجم تافت، خود می‌تواند یکی از علل افزایش حجم گلومرول باشد.

همانطور که بیان شد پارانونایل فنل باعث تولید رادیکال‌های آزاد از جمله ROS و در نهایت سبب ایجاد استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت می‌شود (۲). گلومرول‌ها از دیگر قسمت‌های نفرون نسبت به استرس اکسیداتیو حساس تر هستند (۲۷). استرس اکسیداتیو و افزایش ROS می‌تواند با تحریک سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، موجب عوامل التهابی و در نهایت آسیب به گلومرول شود (۲۸). مولکول‌هایی که ایجاد التهاب می‌کنند می‌توانند توسط سلول‌های مزانشیمیال و اندوتلیال گلومرول تولید و منجر به التهاب گلومرول شوند (۲۹).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد در رت‌هایی که پارانونایل فنل دریافت کردند، افزایش در حجم کورتکس و مدولا، اتساع در لومن توبولهای دور و نزدیک، هیپرتروفی گلومرول‌ها و افزایش در حجم بافت بینابینی و وزن کلیه مشاهده شد. نونایل فنل به عنوان یک آلاینده زیست محیطی باعث آسیب به بافت‌های مختلف بدن می‌شود به طوری که در تعدادی اندام‌ها باعث کاهش وزن و در برخی دیگر موجب افزایش آن می‌شود. در این خصوص، کلیه از جمله اندام‌هایی است که در حضور نونایل فنل دچار افزایش وزن می‌شود (۹) طبق دیگر مطالعات، پارانونایل فنل باعث ایجاد پلی کیستی کلیه می‌شود و به دلیل خاصیت استروژنی که دارد رت‌ها را بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد (۷). مشخص شده است در انسان و حیوانات آزمایشگاهی کلیه دارای گیرنده استروژن می‌باشد (۱۹ و ۲۰) و از آنجایی که رسپتورهای استروژن تکثیر سلول‌های اپی تلیال را میانجی‌گری می‌کنند، می‌تواند به عنوان پتانسیلی برای ایجاد کیست در کلیه باشند (۲۰). به دلیل شباهت ساختاری نونایل فنل به استروژن، اتصال به گیرنده‌های استروژن اپی تلیال در کلیه می‌تواند باعث فعال شدن این گیرنده‌ها و به دنبال آن افزایش تکثیر سلولی، ایجاد کیست و انسداد لوله‌های کلیوی شود. همچنین استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط نونایل فنل از جمله عوامل دیگری است که می‌تواند در ایجاد کیست‌های کلیوی نقش داشته باشد (۷).

لوله‌های کلیوی به خصوص لوله نزدیک از جمله قسمت‌هایی هستند که بسیار تحت تاثیر سمیت نونایل فنل قرار می‌گیرند (۶). طبق نتایج این مطالعه و دیگر مطالعات پارانونایل فنل باعث اتساع و آماس لوله‌های کلیوی در کورتکس و مدولا می‌شود (۸) و (۲۱) و می‌تواند از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو در کلیه باعث افزایش حجم کلیه و اجزای آن شود (۶ و ۷). همچنین ایجاد کیست و انسداد در لوله‌های کلیوی می‌تواند باعث اتساع و افزایش حجم در لومن لوله‌ها و افزایش حجم و تورم در کل کلیه گردد. به دلیل آسیب‌هایی که پارانونایل فنل به کلیه وارد می‌کند، می‌تواند باعث کاهش واحدهای عملکردی در کلیه گردد (۶ و ۷) که می‌تواند به شکل جبرانی موجب هیپرتروفی نفرون‌های سالم باقی مانده و لوله‌های جمع کننده شده و باعث افزایش حجم کلیه گردد.

یکی دیگر از اثرات سوء نونایل فنل بر کلیه، نکروز سلول‌های

اکسیداسیون در کلیه (۱۰) و نتایج مطالعات دیگر مشخص شده است که ویتامین E با خصوصیت آنتی اکسیدانتی خود باعث بهبود فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز و یا حتی افزایش میزان کاتالاز در بافت کلیه می‌شود (۱۱) و با توجه به اینکه این آنزیم‌ها مسئول دفاع بدن در مقابل رادیکال‌های آزاد هستند (۱۰)، ویتامین E توانسته است اثرات مخرب ناشی از القا استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط پارا نونایل فنل در بافت کلیه را تا حد زیادی خنثی و جبران کند.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق، نشان می‌دهد که ویتامین E می‌تواند اثرات نامطلوب ناشی از تیمار با پارا نونایل فنل را روی بافت کلیه رت جبران کند. بنابراین با توجه به وجود این آلاینده در مواد مصرفی روزمره و اینکه انسان به ناچار ممکن است در معرض این آلاینده زیست محیطی قرار گیرد، توصیه می‌شود به مصرف این ویتامین در برنامه غذایی توجه بیشتری شود.

تشکر و قدردانی

این کار در آزمایشگاه تحقیقاتی و استریولوژی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک انجام گردیده و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از کمک‌های ارزشمند خانم منیره محمودی و همچنین آقای مهدی نوده فراهانی تشکر و سپاسگزاری نمایند.

منابع

1. Watanabe H, Suzuki A, Goto M, Lubahn DB, et al. Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *Jornal of Molecular Endocrinology*. 2004; 33: 243-52.
2. Gülcan A, Cevdet U, Ismail B, Metin E, et al. Effects of Nonylphenol on growth parameters and antioxidant defense system in Japanese quails (*Coturnix japonica*). *Kafkas univ vet fak derg*. 2010; 16(4): 537-546.
3. Soares A, Guieysse B, Jeffersona B, Cartmella E, et al. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Invironment international*. 2008; 34(7): 1033-1049.
4. Zgola-Grzeskowiak A, Grzeskowiaka T, Rydlichowska R, Lukaszewska Z. Determination of nonylphenol and short-chained nonylphenol

در این مطالعه تیمار همزمان ویتامین E با پارا نونایل فنل در گروه پارا نونایل فنل + ویتامین E توانست اثرات سوء پارا نونایل فنل بر بافت کلیه را تا حد زیادی جبران کند. همچنان که مطالعه حاضر نشان می‌دهد و طبق نتایج مطالعات قبلی، ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی می‌تواند سطح ROS را در کلیه کاهش دهد (۱۱) و در برطرف کردن تاثیرات سوء پارا نونایل فنل بر بافت کلیه نقش عمده‌ای را ایفا نماید.

با توجه به اینکه ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی اولین خط دفاعی در مقابل پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع در فسفولیپید غشاهای زیستی است، با انتقال هیدروژن فنولیک به پروکسیل رادیکال آزاد اسیدهای چرب غیر اشباع پراکسیده شده، باعث شکسته شدن واکنش‌های زنجیره ای رادیکال آزاد می‌شود به این ترتیب از آسیب‌های ایجاد شده به وسیله رادیکال آزاد تولید شده توسط پارا نونایل فنل در سلول‌ها جلوگیری می‌کند (۳۰). علاوه بر این Malondialdehyde (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در حضور ویتامین E بسیار کاهش می‌یابد (۱۲). همچنین ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی نفوذ پذیری و سیالیت غشای زیستی را حفظ می‌کند و از تخریب آن جلوگیری می‌نماید (۱۲). ویتامین E باعث افزایش بیان E-cadherin در بافت کلیه می‌گردد و تخریب غشای پایه لوله های کلیوی می‌تواند توسط آن بهبود یابد (۳۱). طبق نتایج این مطالعه و دیگر مطالعات وجود آنتی اکسیدانت‌هایی مانند α -tochopherol می‌تواند آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو وارد شده به بافت بینابینی را در کلیه اصلاح کند و آن‌ها را کاهش دهد (۱۲ و ۳۲). همچنین در شرایط استرس اکسیداتیو آنتی اکسیدانت‌ها از جمله ویتامین E می‌توانند هیپرتروفی گلومرول را کاهش دهند (۳۳). ویتامین E علاوه بر اینکه می‌تواند موجب افزایش فیلتراسیون گلومرولی شود (۳۴) تولید سیتوکاین‌ها و عوامل پیش‌ساز التهاب مانند اینترلوکین- 1β ، اینترلوکین-6 و کموکاین IL-8 را در بیماری‌های کلیوی کاهش دهد (۱۲) و به این ترتیب می‌تواند آسیب‌های وارد شده به گلومرول از جمله التهاب را کاهش دهد. Carboxyethyl-hydroxychromans (CEHC) متابولیت‌های محلول در آب ویتامین E می‌باشند که دارای خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانتی هستند. این متابولیت‌ها در بیماری‌های پیشرونده کلیوی افزایش می‌یابند و باعث بهبودی عملکرد کلیه می‌شوند (۱۲). با توجه به نقش حفاظتی ویتامین E در برابر آسیب‌های

- ethoxylate in drain water from an agricultural area. *Chemosphere*. 2009; 75(4): 513-518.
5. Karafakioglu and Aslan R. Taurine prevents Nonylphenol – induced oxidative stress in rats. *Journal of animal and veterinary*. 2010; 9(1): 37-43.
 6. Cooper S, Latendresse JR, Doerge DR, Twaddle NC, et al. Dietary Modulation of p-Nonylphenol-Induced Polycystic Kidneys in Male Sprague Dawley Rats. *Toxsci advance access published*; 2006.
 7. Latendresse JR, Newbold RR, Weist CC, Delclos K B. Polycystic kidney disease induced in F1 sprague-dawley rats fed para-Nonylphenol in a soyfree, casein containing diet. *Toxicological Sciences*. 2001; 62: 140-147.
 8. Chapin RE, Delaney JW, Wang Y, Lanning L, et al. The effects of 4-Nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study. *Toxicological Sciences*. 1999; 52(1): 80-9.
 9. Nagao T, Wada K, Marumo H, Yoshimura S, et al. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod Toxicol* 15. 2001; 293-315.
 10. Jalili SH, Ilkhanipour M, Heydari R, Farshid AA, et al. The effects of vitamin E on endosulfan-induced oxidative stress in rat heart. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2007; 6(4): 375-380.
 11. Derakhshanfar A, Bidadkosh A, Kazemina S. Vitamin E protections against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats: a biochemical and histological study. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2007; 8(3):20.
 12. Thabet MA, James CM. Vitamin E in renal therapeutic regimens. *Pediatr Nephrol*. 2006; 21: 1790-1801.
 13. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003; 75: 469-486.
 14. Hoseini L, Roozbeh J, Sagheb M, Karbalay-Doust S, et al. Nandrolone decanoate increases the volume but not the length of the proximal and distal convoluted tubules of the mouse kidney. *Micron*. 2009; 40(2): 226-230.
 15. Howard C, Reed M. Unbiased Stereology: Three Dimension Measurement in Microscopy. Bios Scientific Publishers, Oxford, United Kingdom. 1998; 1-98.
 16. Pazvant G, Sahin B, Gunes H, Gezerince N, et al. The volume fraction method for the evaluation of kidney: A stereological study. *Ankara Univ Vet Fak Derg*. 2009; 56: 233-239.
 17. Nyengaard JR, Flyvbjerg A, Rasch R. The impact of renal growth, regression and re-growth in experimental diabetes mellitus on number and size of proximal and distal tubular cells in the rat kidney. *Diabetologia*. 1993; 36: 1126-131.
 18. Dezfoolian A, Panahi M, Farideh feizi. Stereological Evaluation of Renal Glomeruli in Offspring of Diabetic Female Rats. *Yakhteh Medical Journal*. 2008; 11(1):17-22.
 19. Li JJ, Li SA. Estrogen carcinogenesis in the hamster kidney: a hormone driven, multistep process. In *Cellular and Molecular Mechanisms of Hormonal Carcinogenesis*. 1996; 255-268.
 20. Concolino G, Lubrano C, Ombers M, Santonati A, et al. Acquired cystic kidney disease: the hormonal hypothesis. *Urology*. 1993; 41: 170-175.
 21. Woo GH, Shibutani M, Chiki T, Hamamura M, et al. A repeated 28-day oral dose toxicity study of nonylphenol in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals. *Arch toxicol*. 2007; 81: 77-88.
 22. Fujimoto Y, Sakuma S, Inoue T, Uno E, et al. The endocrine disruptor nonylphenol preferentially blocks cyclooxygenase-1. *Life Sciences*. 2002; 70: 2209-2214.
 23. Sarita M, Rinoy KSH. Protective Action of an Anti-oxidant (Vitamin-C) Against Bisphenol-toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2011; 11: 25-29.
 24. Klahr S. Urinary tract obstruction. *Semin. Nephrol*. 2001; 21: 133-145.
 25. Tanner GA, Tielker MA, Connors BA, Philips CL, et al. Atubular glomeruli in a rat model of polycystic kidney disease. *Kidney International*. 2002; 62: 1947-1957.
 26. Wu M, Arcaro A, Varga Z, Vogetseder A, et al. Puls mTOR inhibitor treatment effectively controls cyst growth but leads to severe parenchymal and glomerular hypertrophy in rat polycystic kidney disease. *Articles in Press. Am J Physiol Renal Physiol*. 2009.
 27. Sakatsume M, Kadomura M, Sakata I, Imai N, et al. Novel glomerular lipoprotein deposits associated with apolipoprotein E2 homozygosity. *Kidney Int*. 2001; 59: 1911-1918.
 28. Takemura T, Yoshioka K, Murakami K, Akano N, et al. Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis. *Virchows Arch*. 1994; 424(5): 459-464.
 29. Rovin BH, Phan LT. Chemotactic factors and renal inflammation. *Am. J. Kidney Dis*. 1998; 31: 1065-1084.

30. Yesim H, Muberra U. Structural Effect Of Vitamin E on Proximal Tubule and Interstitium in a Rat Model of Cyclosporin A Nephrotoxicity. *Pakistan Journal of Biological Science*. 2005; 8(12): 1712-1719.
31. Wang Q-L, Yuan J-L, Tao Y-Y, Zhang Y, et al. Fuzheng Huayu recipe and vitamin E reverse renal interstitial fibrosis through counteracting TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127: 631-640.
32. Iqbal M, Athar M. Attenuation of iron-nitritoltriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem. Toxicol*. 1998; 36: 485-495.
33. Jin L, Beswick RA, Yamamoto T, Palmer T, et al. Increased reactive oxygen species contributes to kidney injury in mineralocorticoid hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2006; 57(3): 343-357.
34. Sahin A, Algin C, Sezgin C, Ihtiyar E. Effect of vitamin E on kidney preservation using isolated perfused dog kidney. *Turk J Med Sci*. 2004; 34: 161-164.

Stereological Study of the Effect of Vitamin E on Rat Kidney Tissue Treated with Para-Nonylphenol

Soleimani Mehranjani M. Ph.D.^{1*}, Tavakolyan Z. M.Sc.²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran

2. M.Sc. Graduated Student in Biology, Faculty of Science, Arak University

* Email corresponding author: m-soleimani@araku.ac.ir

Received: 21 Aug. 2012

Accepted: 22 Jan. 2013

Abstract

Aim: Para-Nonylphenol is an environmental pollutant which can generate free radicals causing tissue damage. The aim of this study was to investigate the effect of vitamin E as a strong antioxidant on kidney tissue in rats treated with para-Nonylphenol using's tereological technique.

Material and Methods: Twenty fourmale Wistar rats with the mean body weight of 198 ± 20 g were randomly divided into 4 groups (n=6), control, vitamin E (100mg/kg/day), Para-Nonylphenol (250mg/kg/day) and Para-Nonylphenol + vitamin E, and treated orally for 56 days. Finally, the rats were weighted and their right kidneys were taken out, fixed, sectioned, processed and stained using Heidenhain' & azan method. The kidney tissue was then studied using stereological methods. Data were analyzed using one way ANOVA and means difference was considered significant at $P<0.05$.

Results: The mean kidney weight, the total volume of kidney, the volume of cortex and medulla, the volume of proximal and distal tubule lumen, interstitial tissue and the volume of glomerulus and tuft significantly increased in Para-Nonylphenol group compared to the control ones, while the volume of proximal and distal tubules epithelium and the volume of Bowman's space reduced significantly.

Conclusion: Vitamin E could compensate many adverse effects of Para-Nonylphenol on the kidney tissue. Consequently, vitamin E could be used as a potential antioxidant (supplement) against NP intoxication.

Keywords: Kidney, Para-Nonylphenol, Vitamin E, Stereology, Rat