

مقایسه اثر سیکلوسپورین و ترکیب سیکلوسپورین و ویتامین آ بر روی پارانشیم کبد موش بزرگ آزمایشگاهی

*لعیا قهاری^۱، دکتر سارا کاظم نادری^۲، دکتر معصومه دادبی^۳، دکتر سیروس جعفریان^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: امروزه بقای اعضای پیوندی یکی از مطرح ترین مشکلات دنیای پزشکی است و اکثریت افرادی که پیوند اعضا می شوند مجبور به مصرف طولانی مدت داروهای ایمنوساپرسیو می باشند. و مصرف درازمدت این داروها بر روی ارگانهای مختلف اختلالاتی ایجاد می کند. در این مجموعه سعی نموده ایم تا با انجام تحقیقی اثرات سیکلوسپورین (یکی از داروهای تضعیف کننده سیستم ایمنی) و سیکلوسپورین و ویتامین آ را بر روی پارانشیم کبد موش آزمایشگاهی (Rat) بررسی نماییم.

مواد و روش ها: تحقیق به روش مداخله تجربی - کارآزمایی آزمایشگاهی (Experimental.Lab) بر روی تعداد ۴۰ عدد Rat انجام گرفت. که به طور تصادفی به چهار گروه ده تایی تقسیم شدند. به گروه اول سیکلوسپورین با دوز ۴۰mg/kg به همراه روغن زیتون (حلال) به صورت زیرپوستی تزریق گردید. در گروه دوم علاوه بر سیکلوسپورین، ویتامین آ با دوز ۱۰mg/kg به صورت عضلانی تزریق شد. گروه سوم فقط حلال را به صورت زیرپوستی دریافت کردند و به گروه چهارم هیچ ماده ای تزریق نشد. تزریقات به مدت دو هفته هر روز ادامه یافت رتها در دمای ۲۵ و رطوبت ۴۰٪ در شرایط ثابت و آب و غذای آزاد نگهداری می شدند. بعد از سپری شدن مدت زمان تزریق دو نمونه مشخص از کبد هررت را جهت بررسی نمونه برداری کرده و پس از ثبوت در فرمالین ۱۰٪ و مراحل پاساژ بافتی و رنگ آمیزی با H&E، با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. با استفاده از آزمون ANOVA تعداد سلولهای کوپفر مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته ها: نتایج بدست آمده در گروه آزمایشی سیکلوسپورین، به هم ریختن نظم هیاتوسیت ها و احتقان و پرخونی سینوزوئیدها و وجود سلولهای آپوتوتیک، بوده است. فضای پورت و عناصر موجود در آن در مقایسه با گروه نرمال وضوح نداشته و در سلولهای کوپفر خون دیده شده و فضای سینوزوئیدها متسع گشته بود. با مقایسه ای که از دو گروه آزمایشی سیکلوسپورین بعمل آمد در گروهی که ویتامین آ دریافت داشتند تغییرات ذکر شده دیده نشد و یا بسیار مختصر بود.

در گروه سیکلوسپورین نسبت به گروه نرمال کاهش معنی دار در تعداد سلولهای کوپفر دیده شد ($P < 0.001$). در عین حال در گروه سیکلوسپورین و ویتامین آ تعداد سلولهای کوپفر نسبت به گروه سیکلوسپورین تنها افزایش نشان می داد. **نتیجه گیری و توصیه ها:** سیکلوسپورین سبب به هم ریختگی نظم هیاتوسیت ها و پرخونی و اتساع سینوزوئیدها و کاهش سلولهای کوپفر در پارانشیم کبد می شود و اضافه کردن ویتامین آ به آن سبب کاهش قابل توجه عوارض سیکلوسپورین بر روی پارانشیم کبد می شود. **کلمات کلیدی:** سیکلوسپورین، سلولهای کوپفر، ویتامین آ، هیاتوسیت.

مقدمه:

عرضه سیکلوسپورین در سال ۱۹۸۰ به عنوان داروی سرکوبگر

ایمنی در بهبود بقای بیماران بعد از پیوند اعضا نقش اساسی داشته است، ولیکن عوارض ناخواسته ای نیز از این دارو گزارش شده است. که از جمله آن اثرات نامطلوب بر روی کلیه و بر روی پارانشیم

اکثریت افرادی که پیوند اعضا می شوند مجبور به مصرف

طولانی مدت داروهای ایمنوساپرسیو می باشند. و مصرف دراز مدت این داروها بر روی ارگانهای مختلف اختلالاتی ایجاد می کند.

۱- مربی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه بافت شناسی (*نویسنده مسئول)

۲- پزشک عمومی، فارغ التحصیل دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

۳- استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه آسیب شناسی، بیمارستان ۵۰۱ آجا

۴- دکتری حرفه ای پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، کارشناس معاونت پژوهش



حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ارتش در دمای ۲۵ و رطوبت ۴۰٪ و آب و غذای کافی که به طور آزاد در اختیار آنها گذاشته شده بود، نگهداری می شدند.

بعد از سپری شدن مدت زمان تزریق دو نمونه مشخص از کبد هر رت را جهت بررسی برداشته و پس از ثبوت در فرمالین ۱۰٪ و مراحل پساژ بافتی و رنگ آمیزی H&E با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته ها:

مطالعه میکروسکوپی بافت کبد در گروه نرمال: در این گروه بافت کبدی دارای لوبلهای مشخص بود و محدوده لوبلهای مجاور نیز مشخص بود. هپاتوسیت ها بطور منظم و شعاعی به اطراف کشیده شده بودند و تشکیل طنابهای کبدی را می دادند. در فواصل طنابها سینوزوئیدهای کبدی قرار داشته و سلولهای کوپفر با هسته ای کشیده در جدار آنها دیده می شد. فضای پورت و تریاد آن در بافت همبند احاطه کننده آنها قرار داشتند. هپاتوسیت های کبدی با هسته مدور در وسط سیتوپلاسم قرار گرفته، به سلولهای مجاور متصل بودند و حد سلولی بین آنها مشخص بود.

مطالعه میکروسکوپی بافت کبد در گروه حلال: که مانند گروه نرمال تمامی عناصر بصورت طبیعی دیده شد و یافته پاتولوژیکی در آنها رویت نگشت.

مطالعه میکروسکوپی بافت کبد در گروه سیکلوسپورین: نظم سلولهای کبدی از بین رفته و سیتوپلاسم در هپاتوسیت ها یکنواخت نبود. در تعدادی از هپاتوسیت ها بازوفیلی هسته از بین رفته بود و در تعدادی از آنها هسته در کناره سلول دیده شد. سینوزوئیدها بطور نامنظم در بین سلولهای کبدی قرار داشتند و پرخونی سینوزوئیدها دیده شد. در سلولهای کوپفر خون دیده شد و تعداد سلولهای کوپفر نسبت به سایر گروهها کاهش یافته بود. احتقان و مختصری دژنراسیون در تعدادی از نمونه ها دیده شد. در ورید مرکز لوبولی سلولهای خونی زیادی دیده شد و سلولهای آپتوتیک در کنار ورید مرکز لوبولی دیده شدند.

مطالعه میکروسکوپی بافت کبد در گروه سیکلوسپورین و ویتامین A: نظم سلولهای کبدی حفظ شده بود. و هپاتوسیت ها تشکیل طنابهای کبدی را داده بودند. سلولهای کبدی بطور منظم و شعاعی به اطراف کشیده شده بودند. هسته سلولها نرمال بودند و هستک در

کبد و پانکراس می باشد. (۱ و ۲) می دانیم که اسیدرتینوئیک مشتق از ویتامین A، با عمل از طریق پروتئین های گیرنده موجود در هسته سلول، بیان ژن را برای تکامل سلولهای اپی تلیال تنظیم می نماید. (۳) در تحقیقاتی که انجام شده، دیده شده است که سیکلوسپورین سبب کاهش ذخایر ویتامین A در کبد نیز می شود. (۴) لذا در این تحقیق بر آن شدیم که ضمن بررسی اثرات هیستوپاتولوژیک سیکلوسپورین بر پارانشیم کبد، با افزودن ویتامین A به سیکلوسپورین فرضیه کاهش شدت عوارض سیکلوسپورین را بیازماییم.

مواد و روش ها:

این تحقیق به روش Experimental Lab روی تعداد ۴۰ عدد Rat از نژاد Wistar، بالغ، سن ۲ ماهه، نر و وزن بالای ۱۰۰ گرم که از انستیتوی رازی کرج خریداری شدند، انجام گرفت. رتها به ۴ گروه تصادفی ۱۰ تایی تقسیم شدند و برای تمایز آنها را کدبندی و با رنگهای آبی، قرمز و سفید مارکدار کردیم. داروی مصرفی ساندیمون نئورال به صورت کپسول های ۲۵ میلی گرمی و محصول شرکت Norvitis (شهر Basle سوئیس) بود. روغن زیتون به عنوان حلال سیکلوسپورین استفاده شد.

ابتدا رتها را با ترازی ۰/۱٪ وزن نموده و بر حسب آن دوز سیکلوسپورین را به میزان ۴۰ mg/kg برای هر یک محاسبه نمودیم. روغن زیتون را به میزان ۱/۱ سی سی به عنوان حلال که برای تمامی رتها یکسان بود به سیکلوسپورین اضافه کردیم.

گروه اول: گروه سیکلوسپورین + حلال: سیکلوسپورین و حلال را بر حسب دوز محاسبه شده کشیده و پس از بی هوشی رت با اثر بصورت زیرپوستی در ناحیه پشت گردن رت تزریق کردیم.

گروه دوم: گروه سیکلوسپورین + حلال + ویتامین A سیکلوسپورین را مانند گروه اول تزریق کردیم. ویتامین A را نیز به میزان ۱۰ mg/kg محاسبه نموده و بصورت عضلانی در ناحیه پشت ران سمت چپ رت تزریق نمودیم.

گروه سوم: گروه حلال: که فقط ۱/۱ سی سی روغن زیتون بصورت زیرپوستی تزریق کردیم.

گروه چهارم: گروه نرمال: که هیچ تزریقی بر روی رتها صورت نگرفت.

تزریق ها به مدت دو هفته هر روز ادامه یافته و رتها در آزمایشگاه

هیپاتوسیت ها انجام داد متوجه شد اثرات جانبی سیکلوسپورین بر روی کبد دیده می شود، که بصورت هیپر بیلی روبینمیا، افزایش در آمینوترانسفراز والکالین فسفاتاز سرم می باشد. و همین طور با تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن منجر به تغییر ساختمانی و کارکردی سلولی می شود. (۵)

در سال ۱۹۸۸، Backman در تحقیقاتی که بر روی ساخت پروتئین در کبد رت انجام داد، به این نتیجه رسید که سنتز پروتئین کاهش می یابد که وابسته به دوز در خلال درمان است و ثابت کرد که نتایج توکسیک سیکلوسپورین از مهار سنتز پروتئین سلولی ناشی می شود. (۶)

در سال ۱۹۸۸، JF. Cadranel با تحقیقی که بر روی ۸۰ بیمار پیوند قلبی که سیکلوسپورین مصرف می کردند، انجام داد، مشاهده کرد که اختلال در کارکرد کبد از درجه کم تا شدید دیده می شود. انواع اختلالات کبدی از هیپاتیت مزمن - نکروز - سیروز - هیپاتیت B ویروسی تشکیل شده بود. (۷)

در سال ۱۹۷۸، Azais در طی تحقیقاتش به این نتیجه رسید که تزریق سیکلوسپورین به رت های نرمال و رت هایی که دارای کمبود ویتامین A بودند، سبب کاهش ذخایر ویتامین A در کبد رت ها می شود. (۴)

در راستای این تحقیقات پیشنهاد می شود که مطالعات بیشتر بر روی اثرات سیکلوسپورین بر پارانشیم کبد با میکروسکوپ الکترونی انجام شود. همچنین مطالعات بر روی تغییرات آنزیم های کبدی نیز پس از مصرف سیکلوسپورین انجام شود. در عین حال نیز می توان پس از تحقیقات بیشتر و انجام فاز بالینی این مطالعه، برای کاهش عوارض سیکلوسپورین به همراه آن ویتامین A نیز تجویز نمود.

آنها دیده می شد. سینوزوئیدها منظم و خالی از خون بودند و در جدار آنها سلولهای کوپفر دیده می شدند. با کمک آزمون آماری Tukey دیده شد که اختلاف معنی داری در شمارش تعداد سلولهای کوپفر در گروه سیکلوسپورین نسبت به گروه نرمال وجود دارد ($P < 0.001$) و کاهش قابل توجهی در شمارش سلولهای کوپفر در گروه سیکلوسپورین نسبت به گروه نرمال بود. ولیکن در گروه سیکلوسپورین و ویتامین A نسبت به گروه سیکلوسپورین افزایش تعداد سلولهای کوپفر را داشتیم ($P < 0.001$).

بحث و نتیجه گیری :

با توجه به نتایجی که بدست آمد این تحقیق نشان داد که سیکلوسپورین تاثیر منفی بر روی پارانشیم کبد و سلولهای کوپفر دارد، که تا حدودی توسط ویتامین A از شدت عوارض آن کاسته می شود.

سیکلوسپورین A یک پلی پتید حلقوی است که یک داروی ایمونوساپرسیو می باشد و فعال شدن زودرس سلولهای T را مهار می کند. (۱)

حدود ۳۰٪ آن بطور متغیر جذب می شود. و اوج اثر ۴-۳ ساعت است. محل اصلی متابولیسم دارو در سیتوکروم P450 در کبد می باشد. و نیمه عمر آن ۱۹-۲۷ ساعت است. این دارو در بیمارانی که پیوند عضو شده اند برای جلوگیری از پس زدن پیوند و در درمان بیماری پیوند علیه میزبان و در تعدادی از بیماری های اتوایمیون نظیر درمان زودرس دیابت تیپ ۱، سندرم نفروتیک، آرتریت روماتوئید و... استفاده می شود. (۲)

در سال ۱۹۹۷، Wolf. A در طی بررسی هایی که بر روی

References:

1. katzung, Bertram. Basic and clinical pharmacology, 2002:
2. Braunwald Eugene, etal. Harrison's principles of Internal Medicine. 15th ed. MCGraw Hill, 2001.
3. Lehninger, Albert.L. Lehninger principles of biochemistry 3rd ed.
4. Azais V, Rachman F, Gros S, Pascal G, Amedee-Manes Mo. Cyclosporine administration decrease

- liver vitamin A stores in normal and vitamin A-deficient rats. Drug Nutr Interact. 1978; 5(2): 81-8.
5. Wolf. A, Tren delen burg CF, Diez - fernandezc, Prieto P, Hony S, Trommer WE, Cordier. A. Cyclosporin A induced oxidative stress in rat hepatocytes. J Pharmacol Exp Ther. 1997 mar 280 (3) : 1328-34.
6. Backman LA, Ppel kvist EL, Dallner G. Influence



of cyclosporine A on protein synthesis in rat liver.
Exp Mol Pathol. 1988 Aug; 46(1): 38-49.

7. Cadraned GF, Grippom P, Mattei MF, Lunel F,
Paunels A, Rossant P, Kar kouche B, Cabrol A,

Chomette G, Cabrol C, et al. Prevalence and cause
of long-lasting hepatic dysfunction after heart
transplantation:a series of 80 patients. Artif Organs.
1988 Jun; 12(3): 234-8.

Comparison between cyclosporine and combination of cyclosporine and vitamin A administration impact on rat liver parenchyma

* Ghahari, L; MS¹, Kazemnadi, S; MD², Dadpey, M; MD³, Jafarian, S; MD⁴

Abstract :

Background: Cyclosporine is an immunosuppressive drug used largely in organ graft medicine with serious effects on liver parenchyma. We experienced combination of cyclosporine and vitamin A for liver damage risk reduction in rats.

Materials and Methods: We random allocated 40 rats in 4 study groups and inoculated 1. cyclosporine with olive oil subcutaneously; 2. intramuscular cyclosporine and vitamin A; and 3. subcutaneous absolute olive oil. The 4th rat group was not injected and it considered as normal control group. Inoculation was continued for two weeks and rats were kept in standard equal environmental condition. By the end of the injection period they all were dissected and 2 liver tissue samples were studied from each rat using H&E stain and light microscope. Tukey test was used to compare kupfer cells between study groups by considering an alpha level of 0.05 as significant.

Results: Hepatocytes disarrangement, congestion and hyperemia of sinusoids, and apoptotic cell enhancement were outcomes of cyclosporine use in rats. There was also blood in kupfer cells and obscure portal space. In comparison with vitamin A addition cyclosporine group showed increasing of kupfer cells ($P < 0.001$).

Conclusion: Adding Vitamin A to cyclosporine regimen can probably results in liver damage risk reduction.

Keyword: Cyclosporin, Hepatocyte, Kupffer cell, Vitamin A

1-(^{*}Correspondence author), Msc, Army university of medical science, medical faculty, Histology department.

2- General physician, Army university of medical science, medical faculty, Histology department.

3- Assistant professor, Army university of medical science, medical faculty, Pathology department.

4- General physician, Army university of medical science, medical faculty, Research department.