DOI: 10.1234/knh.v0i0.325

مقاله پژوهشی

مجله دانش و تندرستی، دوره ۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

کاهش میزان گلوتاتیون بافت کبد به‌دنبال ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیوی

حسین خواستار[۱]، مهری کدخدایی[۲]، بهجت سیفی[۲]، حمید کلالیان مقدم[۱]، مریم یارمحمدی[۳]، نوشین احمدیان چاشمی[۴]، مهدی خاکساری[۱*]

۱- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه فیزیولوژی.
۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران- دانشکده پزشکی- گروه فیزیولوژی.
۳- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- بیمارستان امام حسین.
۴- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- معاونت بهداشتی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۸، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۱۱/۶

چکیده

مقدمه: *ایسکمی- پرفیوژن مجدد (IR) کلیوی یکی از علل شایع آسیب حاد کلیوی می‌باشد. این شرایط سبب اختلال در عملکرد اندام‌های دوردست (remote organ) مانند ریه، قلب و کبد نیز می‌گردد. لذا در این مطالعه اثر لکوسیت‌ها بر میزان گلوتاتیون بافت کبد به‌دنبال آسیب ناشی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیوی، مورد بررسی قرار گرفت.*

مواد و روش‌ها: *موش‌های سوری Inbred در دو گروه کنترل و IR کلیوی دوطرفه که ۵۰ دقیقه ایسکمی و به‌دنبال آن ۳ ساعت پرفیوژن مجدد را تحمل کردند، قرار گرفتند. سپس نمونه‌ی خون و نمونه‌ی کبد موش‌ها در شرایط بیهوشی جمع‌آوری گردید. لکوسیت‌ها از خون جدا شده و به دو گروه گیرنده منتقل شدند: به این ترتیب که موش‌های گروه "گیرنده کنترل" لکوسیت‌های گروه کنترل و موش‌های گروه "گیرنده IR" لکوسیت‌های گروه IR را دریافت نمودند. بعد از ۲۴ ساعت نیز تمامی موش‌های گیرنده بیهوش گردیده و نمونه‌های خون و کبد آنها جمع‌آوری شد.*

نتایج: *در گروه موش‌های گیرنده IR نسبت‌به گروه موش‌های گیرنده کنترل گلوتاتیون (GSH) به‌طور معنی‌دار کاهش یافت.*

نتیجه‌گیری: *این نتایج نشان داد که آسیب کبدی ناشی از انتقال لکوسیت‌ها به‌دنبال ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیوی، احتمالاً به سبب القای استرس اکسیداتیو در این بافت انجام می‌شود.*

واژه‌های کلیدی: ایسکمی کلیوی، اندام‌های دور دست، آسیب کبدی، لکوسیت‌ها، استرس اکسیداتیو.

[*] **نویسنده مسئول:** شاهرود- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه، **تلفن:** ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۵۴، **نمابر:** ۰۲۳-۳۲۳۹۴۸۰۰، **Email:** khaksari417@yahoo.com

ارجاع: خواستار حسین، کدخدایی مهری، سیفی بهجت، کلالیان مقدم حمید، یارمحمدی مریم، احمدیان چاشمی نوشین، خاکساری مهدی. کاهش میزان گلوتاتیون بافت کبد به‌دنبال ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیوی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۳؛۹(۳):۷۷-۸۱.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

مرگ‌ومیر ناشی از آسیب حاد کلیوی (ARF: acute renal failure) علی‌رغم پیشرفت بسیار در امر پیوند کلیه، به‌طور غیرقابل قبولی در ۴۰ سال گذشته بالا باقی‌مانده است. ایسکمی- پرفیوژن مجدد (IR) کلیوی یکی از علل شایع آسیب حاد کلیوی می‌باشد. در بسیاری از موارد بالینی مانند شوک، پیوند اعضاء، عفونت و جراحی‌های عروق IR کلیوی ایجاد می‌شود (۱ و ۲). ۵ تا ۶ درصد بیماران در بخش مراقبت‌های ویژه از ARF رنج می‌برند که برخی از آنها نیاز به دیالیز دارند (۳).

مطالعات زیادی فعال شدن و مهاجرت لکوسیت‌ها را به داخل بافت کلیه گزارش کرده‌اند. لکوسیت‌های فعال شده متابولیت‌های فعال اکسیژن (ROS: reactive oxygen species) را تولید می‌کنند همچنین تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی را افزایش می‌دهند سایتوکاین‌ها نیز با فعال کردن لکوسیت‌ها نقش مهمی در گسترش آسیب ناشی از ایسکمی دارند (۴).

شایان ذکر است، آسیب ایجاد شده در یک اندام می‌تواند پاسخی را ایجاد کند که بر روی اندام‌های دیگر تأثیر بگذارد.

مطالعات اپیدمیولوژیک در این زمینه، نشان می‌دهد که آسیب IR کلیوی نیز موجب اختلال در اندام‌های دیگر مانند مغز، ریه و کبد می‌گردد (۱، ۵ و ۶).

در مطالعات انجام شده بر روی بیماران مبتلابه نارسایی حاد کلیوی نشان داده شد که این نارسایی تنها دلیل شایع مرگ نمی‌باشد، بلکه مرگ‌ومیر این بیماران به‌علت نارسایی قلبی و سپس به‌علت نارسایی کبدی بوده است (۷).

گلوتاتیون شاخص اولیه تعیین میزان استرس اکسیداتیو درون سلولی به‌شمار می‌رود. این عامل تیولی به عوامل اکسیداتیو حساس است، درنتیجه درصورت افزایش این عوامل میزان گلوتاتیون کاهش می‌یابد. گلوتاتیون اعمال فیزیولوژیک مهمی در بدن دارد که شامل خنثی کردن رادیکال‌ها با واکنش مستقیم با آنها، خنثی کردن پراکسید هیدروژن و پراکسیدهای لیپیدی و نقش کوآنزیمی و... می‌باشد (۸).

باتوجه به موارد فوق، در این مطالعه بر آن شدیم تا تغییرات گلوتاتیون بافت کبد را به‌دنبال آسیب ناشی از انتقال لکوسیت‌های فعال شده در اثر ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیوی به موش‌های سالم بررسی نماییم.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش بنیادی تعداد ۴۰ سر موش سوری BALB/c نر در محدوده وزنی ۳۵ – ۲۵ گرم استفاده شد که از انستیتو پاستور کرج تهیه گردید. حیوانات در شرایط استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و حرارت ۲+۲۲° نگهداری می‌شدند و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. مسایل اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی نظیر بیهوشی در هنگام جراحی، براساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شاهرود رعایت گردید تا حتی‌الامکان موجب درد و رنج حیوان نگردد.

موش‌ها سوری به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند:

۱) گروه موش‌های ایسکمی -پرفیوژن مجدد دهنده لکوسیت (IR دهنده).

۲) گروه موش‌های کنترل دهنده لکوسیت (کنترل دهنده).

۳) گروه موش‌های دریافت‌کننده لکوسیت از نمونه خون گروه IR دهنده (گیرنده IR).

۴) گروه موش‌های دریافت‌کننده لکوسیت از نمونه خون گروه کنترل دهنده (گیرنده کنترل).

گروه اول و دوم با تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش گردیده و در حین بیهوشی فشار سیستولیک شریانی از طریق Cuff Tail که به دستگاه Power Lab/4sp ساخت (AD Instruments, Australia) متصل بود کنترل و ثبت شد.

سپس تحت شرایط استریل برش در خط وسط روی شکم ایجاد گردید. در گروه IR دهنده با استفاده از کلمپ بولداگ، شریان کلیوی به مدت ۵۰ دقیقه بسته شد و پس از آن ۳ ساعت پرفیوژن مجدد برقرار گردید. در گروه کنترل دهنده نیز تمام اعمال جراحی فوق انجام شد، اما شریان‌های کلیوی مسدود نگردید. در پایان، از قلب گروه‌های دهنده خونگیری انجام شد و بافت کبد نیز جمع‌آوری گردید. همچنین لکوسیت‌ها با کمک کلرور آمونیوم جدا گردیدند. بدین ترتیب که بعد از اتمام سانتریفوژ خون و جمع‌آوری پلاسما، ۱۴ برابر حجم خون محلول آمونیوم کلراید سرد ۱ مولار به آن اضافه گردیده و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به آرامی تکان داده شد تا رنگ محلول قرمز روشن گردید. سپس با دور ۲۵۰g در ۴°C به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سوپ فوقانی به آرامی تخلیه شده و ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات به آن اضافه گردید. بعد از هم زدن مجدداً محلول با دور ذکر شده سانتریفوژ گردید و یک‌بار دیگر نیز مرحله شستشو تکرار شد. در انتها به لکوسیت‌های رسوب شده ۵۰۰ میکرولیتر نرمال سالین اضافه گردیده و جهت شمارش لکوسیت‌ها ۱۰ میکرولیتر از این محلول با ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو مخلوط گردیده و توسط لام نئوبار لکوسیت‌های زنده شمارش شد. شایان ذکر است سیتوپلاسم لکوسیت‌های مرده توسط تریپان بلو آبی تیره می‌شود. سپس حجم مناسبی از محلول رنگ نشده که شامل ۵ میلیون لکوسیت می‌باشد (تقریباً ۰/۳ میلی‌لیتر) به روش تزریق دمی به موش‌های پذیرنده انتقال داده شد.

تعداد ۱۰۶ × ۵ لکوسیت ازگروه ۱ (IR دهنده) به گروه ۳ (گیرنده IR) و همین تعداد لکوسیت از گروه ۲ (کنترل دهنده) به گروه ۴ (گیرنده کنترل) به روش تزریق از راه ورید دمی انتقال داده شد. پس از ۲۴ ساعت، نمونه خون و بافت کبد از حیوانات گروه‌های گیرنده جمع‌آوری گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

جهت ارزیابی عملکرد کبدی نیز آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (AST: aspartate aminotransferase) سرم و جهت بررسی نارسایی حاد کلیوی نیز BUN و کراتینین سرم اندازه‌گیری گردید. جهت بررسی میزان استرس اکسیداتیو نیز گلوتاتیون کل (Total) با استفاده از روش تایبتزی اندازه‌گیری شد (۹ و ۱۰).

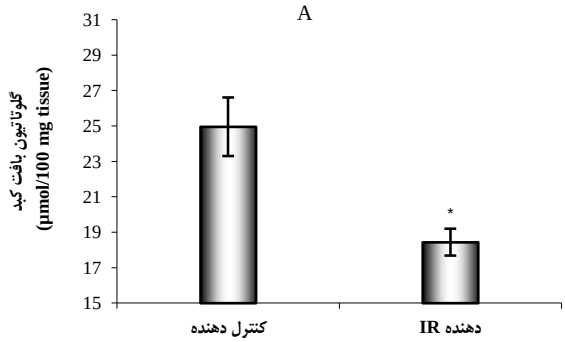
نتایج

در این مطالعه تفاوت معنی‌داری بین میانگین فشار سیستولیک گروه IR دهنده و گروه کنترل دهنده مشاهده نگردید (نمودار ۱).

هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار فشار سیستولیک برحسب میلی‌متر جیوه می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نمی‌گردد.

BUN و کراتینین سرم در گروه IR دهنده نسبت‌به گروه کنترل دهنده افزایش معنی‌دار داشت. همچنین آنزیم AST سرم در گروه IR دهنده افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل دهنده نشان داد. همچنین در گروه گیرنده IR نیز آنزیم AST سرم افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل گیرنده نشان داد.

میزان گلوتاتیون بافت کبد گروه IR دهنده در مقایسه با گروه کنترل دهنده کاهش معنی‌دار نشان داد. همچنین گلوتاتیون بافت کبد گروه گیرنده IR نیز در مقایسه با گروه گیرنده کنترل کاهش معنی‌داری داشت (نمودار ۲).

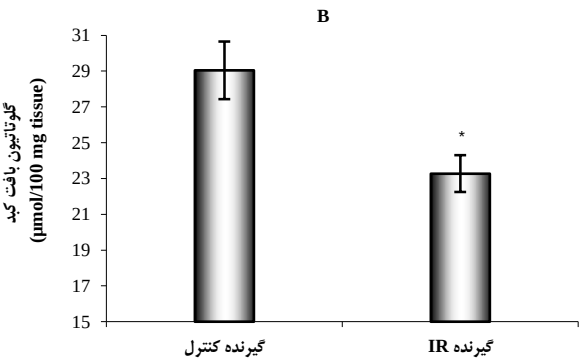


نمودار ۱- فشار سیستولیک در گروه کنترل دهنده و گروه IR دهنده

هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار غلظت کبدی GSH برحسب میکرو مول در ۱۰۰ میلی‌گرم بافت می‌باشد. * اختلاف معنی‌دار را نسبت‌به گروه کنترل در سطح P<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

بحث

ایسکمی– پرفیوژن مجدد یکی از دلایل شایع ایجاد نارسایی حاد کلیوی است. مطالعات اخیر از جمله مطالعه قبلی ما نشان داده که نارسایی حاد کلیوی موجب آسیب ارگان‌های دیگر مانند کبد نیز می‌گردد (۱۱).



نمودار ۲- تغییرات غلظت گلوتاتیون کبدی در گروه‌های دهنده و گروه‌های گیرنده

از آنجا که بافت کبد به‌عنوان یکی از بسترهای عروقی است که در آن عوامل التهابی و اکسیداتیو آزاد می‌شوند، لذا هدف ما در این مطالعه بررسی اثر لکوسیت‌ها در بافت کبد به‌عنوان ارگان Remote به‌دنبال ARF می‌باشد.

در این روش لکوسیت‌ها از خون حیوانی که تحت شرایط ایسکمی– پرفیوژن مجدد قرار گرفته (دهنده لکوسیت) جدا شد و به حیوان سالم دیگر که هیچگونه مداخله‌ای در آن صورت نگرفت (گیرنده لکوسیت) تزریق گردید و بعد از ۲۴ ساعت اثرات آن بر بافت کبد حیوان گیرنده مورد بررسی قرار گرفت.

فشار خون در گروه IR دهنده و گروه کنترل دهنده اختلاف معنی‌داری نداشتند. درنتیجه ایسکمی– پرفیوژن مجدد اثری بر فشار خون حیوان طی آزمایش نداشته است.

همانند مطالعه قبلی ما (۱۲)، در این مطالعه نیز BUN و کراتینین سرم در گروه IR دهنده نسبت‌به گروه کنترل دهنده افزایش معنی‌دار داشت که نشانگر القای ARF به‌دنبال IR کلیوی می‌باشد.

آنزیم AST سرم در گروه IR دهنده افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل دهنده نشان داد که ثابت نمود IR کلیوی موجب آسیب بافت کبد همان حیوان می‌شود. گلاب و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند ۴۵ دقیقه ایسکمی و به‌دنبال آن ۶ ساعت پرفیوژن مجدد یک‌طرفه کلیه موجب آسیب عملکرد کبدی در همان حیوان می‌گردد. آنها مشاهده کردند که میزان فعالیت پلاسمایی AST و لاکتات دهیدروژناز (LDH: lactate dehydrogenase) به‌دنبال IR کلیوی افزایش می‌یابد (۱۳). همچنین به‌دنبال انتقال لکوسیت‌ها در گروه گیرنده IR نیز آنزیم AST سرم افزایش معنی‌دار در مقایسه با گروه گیرنده کنترل نشان داد که این یافته نیز همانند مطالعه قبلی ما (۱۴) نقش لکوسیت‌های انتقال داده شده در ایجاد آسیب کبدی را تأیید می‌نماید.

کاهش میزان گلوتاتیون بافت کبد گروه IR دهنده در مقایسه با گروه کنترل دهنده نشانگر القای استرس اکسیداتیو به‌دنبال ARF

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشد. سرتیسر و همکاران نشان دادند که IR کلیوی موجب افزایش تولید ROS در بافت کبد همان حیوان شده و در نتیجه موجب کاهش غلظت گلوتاتیون کبدی می‌شود (۵). ییلدریم و همکاران در مطالعه خود مشاهده کردند که به‌دنبال IR کلیوی، دهیدرواپی آندروسترون که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان نیز عمل می‌کند، سیستم آنتی‌اکسیدانی کبد را بهبود می‌بخشد. IR کلیوی علاوه‌بر اختلال عملکرد کبد موجب آسیب سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی می‌گردد و دهیدرواپی آندروسترون از کاهش غلظت گلوتاتیون در این حالت جلوگیری می‌کند (۱۵). در این مطالعه نشان داده شد که انتقال لکوسیت‌ها به حیوان گیرنده موجب گردید گلوتاتیون بافت کبد گروه گیرنده IR نیز در مقایسه با گروه گیرنده کنترل کاهش معنی‌داری نشان دهد.

در پژوهش حاضر، گلوتاتیون به‌عنوان یکی از مهمترین شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کبد، القا استرس اکسیداتیو را به‌دنبال انتقال لکوسیت‌ها به حیوان پذیرنده تأیید نمود، بنابراین یکی از عواملی که لکوسیت‌ها به‌دنبال IR کلیوی از طریق آن ایجاد آسیب کبدی می‌نمایند می‌تواند القای استرس اکسیداتیو باشد.

References

1. Hassoun H, Grigoryev D, Lie M, Liu M, Cheadle C, Tuder R, et al. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. Am J Physiol Renal Physiol 2007;293(1):F30-40.
2. Zhang Z, Wang S, Huang X, Min W, Sun H, Liu W, et al. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. The Journal of Immunology 2008;181(11):7489.
3. Li X, Hassoun H, Santora R, Rabb H. Organ crosstalk: the role of the kidney. Current Opinion in Critical Care 2009;15(6):481.
4. Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Noguchi T. Activated protein C reduces ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats by inhibiting leukocyte activation. Blood 2000;95(12):3781.
5. Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K, Akbulut G, Dilek O. Changes in hepatic TNF-[alpha] levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. Journal of Surgical Research 2002;107(2):234-40.
6. Liu M, Liang Y, Chigurupati S, Lathia J, Pletnikov M, Sun Z, et al. Acute kidney injury leads to inflammation and functional changes in the brain. Journal of the American Society of Nephrology 2008;19(7):1360.
7. Schwilk B, Wiedeck H, Stein B, Reinelt H, Treiber H, Bothner U. Epidemiology of acute renal failure and outcome of haemodiafiltration in intensive care. Intensive Care Medicine 1997;23(12):1204-11.
8. Rebrin I, Sohal RS. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. Adv Drug Deliv Rev 2008;60(13-14):1545-52.
9. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Analytical Biochemistry 1969;27(3):502-22.
10. Griffith O. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochemistry 1980;106(1):207-12.
11. Khastar H, Kadkhodaee M, Sadeghipour HR, Seifi B, Hadjati J, Najafi A, et al. liver oxidative stress after renal ischemia-reperfusion injury is leukocyte dependent in inbred mice. Iran J Basic Med Sci 2011;14(6):534-9.[Persian].
12. Khastar H, Kadkhodaee M, Seifi B, Aghayan SS. Effect of leukocytes transfer on the induction of liver damage after renal ischemia-reperfusion in inbred mice. Knowledge & Health Journal 2012;7(2):27-33.[Persian].
13. Golab F, Kadkhodaee M, Zahmatkesh M, Hedayati M, Arab H, Schuster R, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage. Kidney Int 2009;75(8):783-92.
14. Khastar H, Kadkhodaee M, Sadeghipour HR, Seifi B, Hadjati J, Delavari F, et al. Leukocyte involvement in renal reperfusion-induced liver damage. Ren Fail 2011;33(1):79-83.
15. Yildirim A, Gumus M, Dalga S, Sahin Y, Akcay F. Dehydroepiandrosterone improves hepatic antioxidant systems after renal ischemia-reperfusion injury in rabbits. Annals of Clinical & Laboratory Science 2003;33(4):459.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Knowledge & Health 2014; Vol 9, No 3
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.1234/knh.v0i0.325
Original Article

Glutathione Reduction in Liver Tissue after Renal Ischemia Reperfusion

Hossein Khastar (Ph.D.)[1], Mehri Kadkhodaee (Ph.D.)[2], Behjat Seifi (Ph.D.)[2], Hamid Kalalian Moghaddam (Ph.D.)[1], Maryam Yarmohammadi (M.D.)[3], Nooshin Ahmadian Chashmi (B.Sc.)[4], Mehdi Khaksari (Ph.D.)[1*]

1- Dept. of Physiology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
2- Dept. of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Dept. of Pathology, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.
4- Vice-Chancellery of Health, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 20 October 2013**, Accepted:** 26 Junuary 2014

Abstract:

Introduction: *Renal ischemia reperfusion (IR) is a common cause of acute renal failure. Renal IR induces remote organ dysfunction such as lung, heart and liver. The aim of this study was to assess the role of leukocytes on the hepatic tissue glutathione as a liver antioxidant index after renal IR injury.*
Methods: *Inbred mice were subjected to either sham operation (sham donor) or bilateral renal IR injury that undergoes 50 min ischemia followed by 3h reperfusion (IR donor). Mice were then anesthetized for collection of blood and liver samples. Leukocytes isolated from blood and then were transferred to two recipient groups: recipient mice that received leukocytes from sham-operated control mice and intact recipient mice that received leukocytes from IR mice. After 24h, recipient mice were anesthetized and blood and liver samples were collected.*
Results: *Hepatic glutathione (GSH) decreased significantly in intact recipient mice that received leukocytes from IR mice in comparison to intact recipient mice received leukocytes from sham-operated control mice.*
Conclusion: *These results suggest that leukocytes are one of the possible factors that contribute to liver damage after renal IR injury and this damage is partly due to the induction of oxidative stress.*

Keywords: Renal ischemia, Remote organs, Liver damage, Leukocyte, Oxidative stress.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** M. Khaksari, **Email:** khaksari417@yahoo.com*

Citation: Khastar H, Kadkhodaee M, Seifi B, Kalalian Moghaddam H, Yarmohammadi M, Ahmadian Chashmi N, Khaksari M. Glutathione reduction in liver tissue after renal ischemia reperfusion. Journal of Knowledge & Health 2014;9(3):77-81.

Archive of SID

www.SID.ir