Archive of SID

مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۱ ، شماره ۳ ، پاییز ۸۵۱۳
صفحات: ۲۱۷ – ۲۲۴

تغییرات آنتی اکسیدانهای کلیه موش صحرایی در یک مدل in vivo ایسکمی-پرفیوژن مجدد

مریم زحمتکش* Ph.D. ، مهری کدخدایی؟ Ph.D. ، رعنا غزنوی* M.Sc.

چکیـده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تغییرات SOD، GSH و α- توکوفرول بافت کلیه در یک مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیه می‌باشد.

روش بررسی: ابتدا موشهای صحرایی بیهوش شده با پنتوباربیتال سدیم تراکئوتومی شدند. سپس شریان فمور برای ثبت فشار متوسط شریانی کانول‌گذاری گردید. انفوزیون سالین از طریق ورید فمور برقرار شد. سپس با ایجاد یک برش شکمی، شریان هر دو کلیه از بافتهای اطراف به دقت جدا شد. برای القای ایسکمی، شریان هر دو کلیه به مدت ۴۰ دقیقه مسدود و سپس ۶ ساعت پرفیوژن مجدد برقرار شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که این مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد سبب کاهش معنی‌دار SOD و GSH بافت کلیه می‌گردد اما تغییری در سطح پلاسمایی و بافتی α- توکوفرول ایجاد نمی‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد، یک رابطه منظم سیستماتیک بین آنتی اکسیدانها وجود دارد. این مصرف تدریجی آنتی اکسیدانها بایستی در پروتکل‌های درمانی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: کلیه، ایسکمی- پرفیوژن مجدد، گلوتاتیون، سوپراکساید دسموتاز، آلفا توکوفرول.

مقـدمـه

ضایعات ناشی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد (Ischemia-Reperfusion; IR) شامل مجموعه‌ای از وقایع متوالی و مرتبط به هم می‌باشند که اندوتلیوم عروق و لکوسیتهای فعال شده را در برمی‌گیرد. در مرحله ایسکمی، اندوتلیوم مستعد تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) می‌باشد و عوامل کموتاکسیک را ترشح می‌کند. بدیهی است که برای بقای بافت دچار ایسکمی، پرفیوژن مجدد (برقراری مجدد جریان خون) ضروری است اما خود، آسیب مضاعفی ایجاد می‌کند که آن را تحت عنوان ضایعات ناشی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد می‌شناسیم (۱).

آسیب یا اختلال مکانیسم های دفاعی آنتی اکسیدانی در زمان پرفیوژن مجدد یکی از دلایل آسیبهای IR در نظر گرفته می‌شود (۱،۲). در بدن سیستم دفاعی جامعی برای حفاظت در برابر اثرات

دریافت مقاله: ۸۵/۳/۲۸، اصلاح مقاله: ۸۵/۸/۲۴، پذیرش مقاله: ۸۵/۹/۲۰

؟ استادیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه تهران، تهران ـایران
* گروه فیزیولوژی، دانشگاه تهران
آدرس پست الکترونیکی: mehr45@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مخرب عوامل اکسید کننده وجود دارد که شامل آنتی‌اکسیدانهای کاتالیتیک (مانند سوپراکساید دسموتاز) و آنتی اکسیدانهای با وزن مولکولی کم (مانند آلفا توکوفرول و گلوتاتیون) می‌باشند. اما این دفاعها در بسیاری از شرایط پاتولوژیک مغلوب شده، اکسیدانها باعث آسیب سلولی می‌شوند. عدم تعادل اکسیدانها و آنتی‌اکسیدانها را استرس اکسیداتیو می‌نامند (۲).

در میان آنتی‌اکسیدانها، آنزیم سوپراکساید دسموتاز (Super Oxide Dismutase; SOD) اولین و مهمترین خط دفاعی بر علیه ROS می‌باشد که در واکنش دسموتاسیون با آنیون سوپراکساید شرکت می‌کند و نقش سمیت‌زدایی خود را ایفا می‌نماید. در حال حاضر سه ایزوفرم مختلف این آنزیم در پستانداران شناخته شده و بیان ژنی آن در محیط کشت و در شرایط in vivo سلول را در برابر اثرات مخرب مدلهای مختلفی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد حفاظت کرده است. اثرات مفید و حفاظتی آنزیمهای SOD در بسیاری از بیماریها نشان داده شده است (۳،۴).

تری‌پپتید ال-گاما گلوتامیل-ال-سیستئین-گلیسین یا گلوتاتیون (Glutathione; GSH) ترکیب عمده تیول در گیاهان، میکروارگانیسم‌ها و همه بافتهای پستانداران است و فاکتوری اساسی در حفظ تعادل اکسیداسیون-احیای سلول می‌باشد. از اعمال حیاتی GSH می‌توان به سمیت‌زدایی الکتروفیلها، حفظ وضعیت تیول پروتئینها، منبع ذخیره برای سیستئین و تعدیل فرآیندهای حیاتی سلول مانند سنتز DNA و سیستم ایمنی اشاره نمود. GSH همچنین گونه‌های فعال اکسیژن را scavenge می‌کند و به علاوه فرم اکسید شده آنتی‌اکسیدانهای دیگر را دوباره احیا می‌نماید (۵).

ویتامین E، آنتی‌اکسیدانی محلول در چربی است و واکنشهای زنجیره‌ای رادیکالهای آزاد را متوقف می‌کند؛ مشخص شده است این ماده در پیشگیری از پراکسیداسیون چربیها و دیگر وقایع اکسیداتیو ناشی از رادیکالهای آزاد مؤثر است. ویتامین E به فرم آلفا توکوفرول، غشاهای بیولوژیک را از تخریب اکسیداتیو محافظت می‌کند و به طور فیزیکی نفوذپذیری غشا و سیالیت آن را تنظیم می‌نماید (۶). همچنین سبب کاهش کموتاکسی نوتروفیلها و مهار تجمع پلاکتها می‌شود. بنابراین، علاوه بر اثر آنتی‌اکسیدانی، خصوصیات ضدالتهابی و ضدانعقادی نیز دارد. همچنین می‌تواند از آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری نماید. وجود آن برای سمیت‌زدایی اکسیدکننده‌هایی مانند پراکسی‌نیتریت نیز ضروری است. اندازه گیری ویتامین E علاوه بر این که شاخص خوبی از پراکسیداسیون چربیهاست، به عنوان آخرین سد دفاعی در مقابله با ضایعات IR بسیار اهمیت دارد. در واقع تغییرات ویتامین E در شرایط IR می‌تواند شدت استرس اکسیداتیو را نشان دهد (۶،۷).

با افزایش زمان ایسکمی، آسیب پیشرونده‌ای در دفاعهای آنتی‌اکسیدانی کلیه‌ها مشاهده می‌شود. از سوی دیگر، کاهش فعالیتهای آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (مانند SOD) با پراکسیداسیون لیپیدی قابل توجهی همراه نبوده است. گزارشهایی مبنی بر افزایش پیشرونده پراکسیداسیون از کورتکس به سوی مدولا با افزایش زمان ایسکمی در دست است، اما به طور کلی، در مورد تغییرات شاخص‌های آنتی اکسیدانی اندازه‌گیری شده در مطالعات مختلف اختلاف نظر وجود دارد. با توجه به این که در مطالعه قبلی (۸) نشان دادیم که ۴۰ دقیقه ایسکمی کلیه و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد در موش صحرایی سبب کاهش معنی‌دار شاخص‌های عملکردی و بافتی کلیه می‌شود، در این مطالعه بر آن شدیم که میزان تغییرات SOD، GSH و α- توکوفرول بافت کلیه را در این مدل in vivo ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیه بررسی کنیم.

روش بررسی

ویتامین E، ویتامینE استات، BHT و محلولهای HPLC (متانول، اتانل و هگزان) از شرکت مرک (آلمان) و کلاژناز و پروتئیناز K از Roche خریداری شد. پنتوباربیتال سدیم، DTNB (5,5' Dithio bis 2-Nitrobenzoic acid)، P- نیترو فنیل بتا دی گلوکوزامینیداز و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید NADPH از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد.

روش اجرا. در این مطالعه از موشهای صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۷۰ گرم با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد استفاده شد. حیوانات توسط تزریق

www.SID.ir

Archive of SID

داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۶۰mg/kg) بیهوش شدند، سپس با تزریق ۱۲ mg/kg/h پنتوباربیتال سدیم، تا پایان آزمایش بیهوشی حفظ گردید. در تمام این مدت حیوان گرم نگهداشته شده، به منظور اطمینان از باز بودن راه هوایی و تسهیل تنفس، تراکئوتومی انجام شد. سپس شریان فمور به منظور مانیتور کردن فشار متوسط شریانی (Mean Arterial Pressure, MAP) کانول‌گذاری شد. ورید فمور نیز به منظور تجویز دارو و انفوزیون مایعات کانول‌گذاری گردید. سپس با یک برش عرضی روی شکم، Renal pedicles نمایان گردید و شریان هر دو کلیه از بافتهای اطراف به دقت جدا شد. برای به حداقل رساندن خونریزی از کوتر قلمی استفاده شد. پس از اتمام جراحی، یک گاز آغشته به نرمال سالین جهت جلوگیری از خشک شدن احشا روی شکم قرار داده شد. بعد از اتمام اعمال جراحی به مدت ۶۰ دقیقه به حیوان فرصت داده شد تا در وضعیت پایدار قرار گیرد. سپس نمونه‌هایی که فشار متوسط شریانی بالاتر از ۹۵ میلی‌متر جیوه داشتند، به طور تصادفی در گروه کنترل- جراحی یا Sham و گروه IR قرار گرفتند. تعداد موشهای صحرایی در هر گروه ۷ عدد بود.

در گروه کنترل- جراحی یا Sham تمام مراحل جراحی فوق انجام گردید ولی شریانهای کلیه مسدود نشد. موشها در تمام مدت آزمایش تحت بیهوشی بودند و انفوزیون سالین به میزان ۶ml/kg/h دریافت کردند. در گروه IR هر دو شریان کلیوی راست و چپ، توسط کلمپ بولداگ به مدت ۴۰ دقیقه مسدود شد و سپس با باز کردن کلمپ، به مدت ۶ ساعت پرفیوژن مجدد برقرار شد و در این مدت موشها انفوزیون سالین به میزان ۶ ml/kg/h دریافت کردند. در انتها یک نمونه خون برای اندازه‌گیری α- توکوفرول پلاسما گرفته شد و بافت کلیه برای اندازه‌گیری α- توکوفرول، GSH و SOD خارج گردید.

استخراج ویتامین E از پلاسما. استخراج ویتامین E بر اساس متد آرنود (۹) انجام شد. برای جلوگیری از پراکسیداسیون چربیها از BHT (Butylated Hydroxyl Toluene) استفاده شد و تمام مراحل کار در نور کم انجام گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر اتانل و ۱۰۰ میکرولیتر آلفا توکوفرول استات (به عنوان استاندارد داخلی) به ۲۰۰ میکرولیتر از پلاسما اضافه گردید و پس از مخلوط کردن، ۵۰۰ میکرولیتر هگزان به آن اضافه شد. مخلوط نهایی به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد و ۲۵۰ میکرولیتر از فاز بالایی آن خارج و توسط گاز نیتروژن خشک گردید و جهت آنالیز نهایی در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

استخراج ویتامین E از بافت کلیه. استخراج ویتامینE از بافت کلیه بر اساس متد پنگ (۱۰،۱۱) انجام شد. ۵۶۰ میکرولیتر بافر فسفات، ۱/۵ میلی گرم BHT و ۷۰ میکرولیتر از محلول کلاژناز (۵۰ میکروگرم بر میکرولیتر) به ۱۰۰ میلی گرم از بافت کلیه اضافه شد و در محیط سرد هموژن گردید. پس از افزودن ۷۰ میکرولیتر از محلول پروتئیناز (۲۰ میکروگرم بر میکرولیتر)، ۲۵۰ میکرولیتر از سوپ حاصله به یک لوله شیشه‌ای ۱۰ میلی لیتری منتقل شد. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول یک درصد SDS-BHT-اتانل به منظور رسوب پروتئینها و ۱۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی به آن اضافه گردید و مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از فاز بالایی خارج و توسط گاز نیتروژن خشک گردید و جهت آنالیز نهایی در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

روش اندازه گیری ویتامین E . در این مطالعه ویتامین E توسط HPLC (High Performance Chromatography Liquid) فاز معکوس سنجیده شد. از پمپ و انژکتور مدل E-۶۰۰ شرکت واترز، ستون Nova pack C18 به ابعاد ۳۰ × ۳/۹ سانتی‌متر حاوی ذرات سیلیکا با قطر ۵ میکرومتر و پیش ستون Nova pack C18 استفاده شد. در فاز محلول یا متحرک، متانول با جریان ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر تنظیم شد. از شاخص یا دتکتور UV-486 (در طول موج ۲۹۲ نانومتر) استفاده شد. نمونه‌های خشک شده با گاز ازت در ۲۰۰ میکرولیتر متانول حل شد و ۵۰ میکرولیتر از آن توسط سرنگ هامیلتن تزریق گردید. از ویتامین E استات به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد و نسبت سطح زیر منحنی نمونه به سطح زیر پیک استاندارد داخلی محاسبه شد.

روش اندازه گیری گلوتاتیون . گلوتاتیون با استفاده از روش آنزیمی Tietze و اصلاحات Griffith اندازه‌گیری شد (۱۲). در این روش گلوتاتیون توسط DTNB (۵ و ′۵ دی تیو بیس-۲-

www.SID.ir

Archive of SID

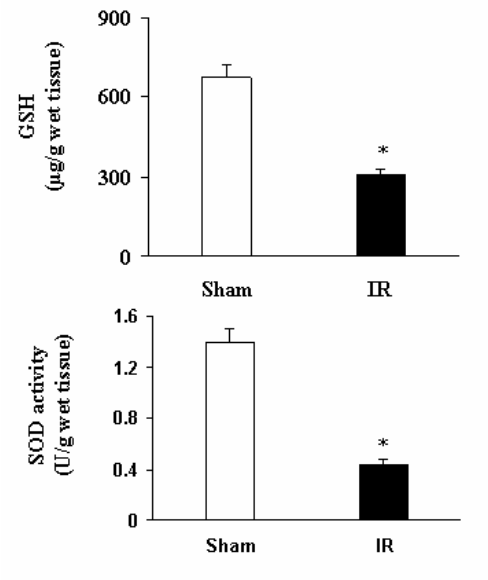
نیتروبنزوئیک اسید) اکسید شده، در حضور گلوتاتیون ردوکتاز توسط NADPH احیا شد. میزان یا سرعت تشکیل ۲- نیترو ۵ تیوبنزوئیک اسید در طول موج ۴۱۲ نانومتر مانیتور شده، مقدار گلوتاتیون از مقایسه نتایج با منحنی استاندارد به دست آمد. میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت کلیه در مخلوط ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات-EDTA و ۰/۶ میلی‌لیتر محلول TCA (۱۰٪)، در روی یخ هموژن شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. یک میلی‌لیتر از بخش فوقانی سوپ با ۲ میلی‌لیتر اتر سرد مخلوط و سپس Shake شد تا اتر کاملا از بین برود و بعد دوباره سانتریفوژ گردید. در نهایت سوپ حاصل در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

روش اندازه گیری آنزیم سوپراکساید (SOD) . غلظت SOD در بافت کلیه بر اساس اکسیداسیون NADPH، با روش Paoletti (۱۳) اندازه‌گیری شد. در این روش آنیون سوپراکساید در حضور EDTA، کلرید منگنز و مرکاپتو اتانول تولید می‌شود و حضور SOD در محیط از اکسیداسیون نوکلئوتید جلوگیری می‌کند. کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار گرفت و نتایج از منحنی استاندارد استخراج گردید. میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت کلیه در ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات-EDTA در روی یخ هموژن شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و سوپ حاصل در فریزر ۲۰- نگهداری شد.

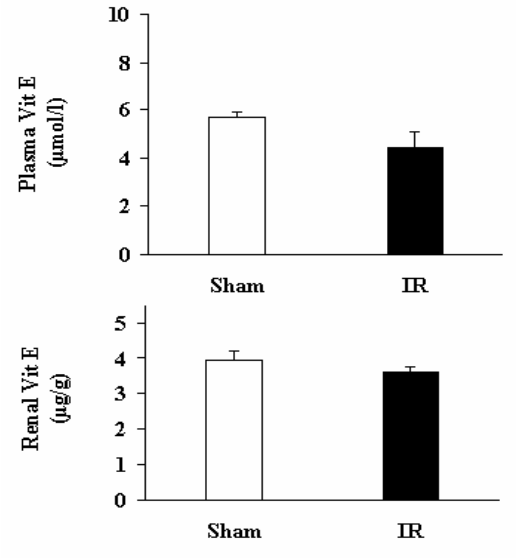
روش آماری . در این تحقیق برای مقایسه نتایج از آزمون Independent Samples t-test استفاده شد. اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. داده ها به صورت Mean± SEM گزارش شده است.

یافتـه‌هـا

در تمام مدت آزمایش، فشار سیستولیک، فشار متوسط شریانی و تعداد ضربان قلب مانیتور و ثبت گردید. در هر گروه مقدار MAP در زمان آزمایش با مقدار پایه تفاوت معنی‌داری نداشت. زمان ۴۰ دقیقه ایسکمی کلیه و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد سبب کاهش معنی‌دار GSH در مقایسه با گروه Sham شد (۱۵/۷±۳۰۵/۳ در برابر ۲۰/۱۸±۶۶۷ میکروگرم در هر گرم بافت، $p \leq ۰/۰۱$). در مورد SOD نیز (۰/۰۴۹±۰/۴۳ در برابر ۰/۱۱±۱/۳۹ واحد در هر



نمودار ۱. هر یک از ستونها نمایانگر Mean ± SEM تغییرات GSH و SOD می باشد. موشهای صحرایی در گروه Sham فقط جراحی شده، در تمام مدت آزمایش تحت بیهوشی با پنتوباربیتال سدیم بودند. گروه ایسکمی- پرفیوژن مجدد (IR) در معرض ٤٠ دقیقه انسداد دوطرفه شریانهای کلیه و ٦ ساعت پرفیوژن مجدد قرار داشتند که اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham در سطح $p < ۰/۰۵$ نشان می دهد (n=۷).

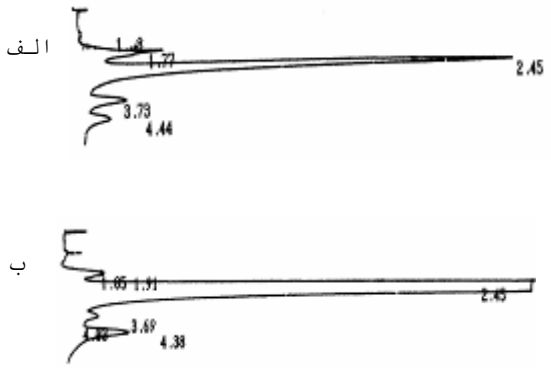


نمودار ۲. هر یک از ستونها نمایانگر میانگین SEM±Mean تغییرات ویتامین E پلاسما و بافت کلیه می باشد. موشهای صحرایی در گروه Sham فقط جراحی شده، در تمام مدت آزمایش تحت بیهوشی با پنتوباربیتال سدیم

www.SID.ir

Archive of SID

بودند. گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد (IR) در معـرض ٤٠ دقیقه انسداد دوطرفه شریانهای کلیه و ٦ ساعت پرفیـوژن مجدد قرار داشتند (n=۷).



نمودار ۳. نمونه‌ای از کروماتوگرام‌های مربوط به استخراج ویتامین E از بافت کلیه
الف) گروه Sham
ب) گروه ایسکمی- پرفیوژن مجدد (IR)
فاز محلول یا متحرک، متانول با جریان ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر می باشد. زمان ٠/٠٤ ± ۳/٦۹ مربوط به ویتامین E و زمان ٠/٠٤ ± ٤/۳۹ مربوط به آلفا توکوفرول استات (استاندارد داخلی) می باشد.

گرم بافت، $p \leq ۰/۰۵$) کاهش معنی‌داری در گروه IR نسبت به گروه Sham مشاهده شد که نتایج آن در نمودار ۱ نشان داده شده است. از نظر میزان ویتامین E پلاسما (۰/۲۱±۵/۶۹ در برابر ۰/۶۱±۴/۴۴ میکرومول در هر لیتر، $p \geq ۰/۰۵$) و بافت کلیه (۰/۲۵±۳/۹۵ در برابر ۰/۱۲±۳/۶۱ میکروگرم در هر گرم بافت، $p \geq ۰/۰۵$) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد که نتایج آن در نمودار ۲ ارائه شده است. نمونه‌هایی از کروماتوگرام‌های مربوط به استخراج ویتامین E در نمودار ۳ ارائه شده است.

بحـــث

یکی از دلایل آسیبهای ناشی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد را آسیب یا اختلال آنتی اکسیدانهای اندوژن می‌دانند. اما اطلاعات بسیار اندکی در مورد تغییرات آنتی‌اکسیدانها در مدل‌های مختلف ایسکمی- پرفیوژن مجدد در کلیه موجود است (۱۴). هدف این مطالعه بررسی تغییرات SOD، GSH و α- توکوفرول بافت کلیه در یک مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیه بود.

در شرایط استرس اکسیداتیو برای حفظ تعادل اکسیداسیون- احیای سلول، GSSG توسط MRP1(Multidrug-resistance protein) و MRP2 از سلول خارج می‌شود. در واقع در استرس اکسیداتیو شدید، GSH سلول تخلیه می‌شود. بنابراین شاخص خوبی از وضعیت اکسیداسیون- احیای سلول می‌باشد. در این تحقیق ۴۰ دقیقه ایسکمی کلیه و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد سبب کاهش معنی‌دار GSH در مقایسه با گروه Sham شد که نشان دهنده ایجاد استرس اکسیداتیو و عدم تعادل در سیستم آنتی‌اکسیدانی و اکسیدانها می‌باشد. گونه‌های فعال اکسیژن توسط GSH، Scavenge می‌شوند (۱۵). تولید این گونه‌های فعال، کاهش GSH در شرایط IR را توجیه می‌نماید. در مطالعه Reynose و همکارانش نیز، کاهش GSH بعد از یک دوره ایسکمی ۷۵ دقیقه و پرفیوژن مجدد ۱ و ۲۴ ساعته گزارش شد. آنها کاهش GSH را به عنوان شاخصی از آسیبهای کلیوی ناشی از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن در نظر گرفتند (۱۶). در مطالعه کنونی، فعالیت SOD نیز در گروه IR کاهش یافت که نشان دهنده تولید بیشتر از حد طبیعی آنیون سوپراکساید می‌باشد. این نتایج موافق با گزارش Chander و همکارانش در سال ۲۰۰۶ می‌باشد. آنها بعد از ایجاد نفرکتومی راست، شریان کلیه چپ را به مدت ۴۵ دقیقه مسدود نمودند و کاهش GSH و فعالیت SOD در بافت کلیه را بعد از ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد گزارش کردند (۱۷). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۰ انجام شد، در مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد در موش صحرایی، میزان SOD بعد از زمانهای ایسکمی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه کاهش معنی‌داری نشان داد (۱۴). کاهش میزان فعالیت SOD احتمالا به دلیل غیر فعال شدن آنزیم یا تخریب آن توسط عوامل اکسیدانی مانند پراکسی نیتریت می‌باشد که در زمان ایسکمی و پرفیوژن مجدد تولید می‌شوند. علاوه بر اثر اکسیدانها، غیر فعال شدن در اثر کربوکسیلاسیون و نیتروزیلاسیون نیز می‌تواند صورت پذیرد (۱۴،۱).

در مطالعات مختلف، شاخص‌های متعدد استرس اکسیداتیو در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد اندازه‌گیری می‌شوند. اما در برخی مطالعات، علیرغم تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن و آسیبهای ناشی از آن، برخی آنتی‌اکسیدانها تغییری نمی‌کنند. بنابراین هدف از اندازه‌گیری این شاخص‌ها در این مطالعه، بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

تغییرات آنتی‌اکسیدانهای خط اول و دوم در یک مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد بود. با وجود کاهش GSH و فعالیتSOD در گروه IR و ایجاد استرس اکسیداتیو، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان ویتامین E پلاسما و بافت کلیه در گروه IR مشاهده نشد. یک توضیح احتمالی برای عدم تغییر ویتامین E می‌تواند مهاجرت آن از ارگانهای دیگر به پلاسما و بافت کلیه باشد. Elsayed و همکارانش در سال ۱۹۹۰ دو گروه موش صحرایی را مورد بررسی قرار دادند. یک گروه رژیم غذایی فاقد ویتامین E و گروه دیگر ویتامین E نشاندار شده با کربن ۱۴ را به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. دو گروه به مدت ۵ روز در معرض اوزون قرار داشتند. سپس مقدار ویتامین E در تمام بافتها اندازه‌گیری شد و مهاجرت ویتامین E نشاندار شده به ریه در پاسخ به استرس اکسیداتیو گزارش گردید (۱۸). در مطالعه کنونی نیز ممکن است مهاجرت ویتامین E از بافتهایی با ذخیره بالا مثل کبد به پلاسما و سپس بافت کلیه صورت گرفته باشد. البته از آن جایی که در مطالعه کنونی سطح ویتامین E در کبد به طور همزمان اندازه‌گیری نشده است، نمی‌توان به طور قطع، مهاجرت را دلیل این نتایج دانست. به علاوه شواهدی وجود دارد که استرس اکسیداتیو، پروتئینهای انتقال دهنده α- توکوفرول (TTP) را تنظیم می‌کند. افزایش سطح TTP در مغز افرادی که دچار بیماریهای همراه با استرس اکسیداتیو هستند (سندرم داون و بیماری آلزایمر)، گزارش شده است (۱۹) که پیشنهاد کننده تنظیم افزایشی TTP مغز توسط استرس اکسیداتیو می‌باشد. بنابراین با توجه به این که TTP در کلیه نیز وجود دارد (۲۰) عدم مشاهده تغییر ممکن است به دلیل اثرات تنظیمی آن باشد. نتیجه‌گیری قطعی در خصوص تغییرات این پروتئین در شرایط اکسیداتیو نیازمند مطالعات بیشتر و گسترده‌تری می باشد. در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد، ابتدا اکسیدانهای محلول در آب مانند ویتامین C، گلوتاتیون و SOD اکسید می‌شوند و سپس آنتی اکسیدانهای محلول در چربی مانند ویتامین E وارد عمل می‌گردد. این موضوع نشان می‌دهد که یک رابطه منظم سیستماتیک بین آنتی‌اکسیدانها وجود دارد و در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد، قبل از مصرف ویتامین E، آنتی‌اکسیدانهای دیگر مصرف و سپس ویتامین E برای حفظ تمامیت غشاهای بیولوژیک وارد عمل می‌شود (۲۱). این تغییرات منظم سیستماتیک در مطالعه Haramaki و همکارانش در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد قلب مشاهده شده است. آنها در مطالعه فوق نشان دادند که آنتی اکسیدانهای هیدروفیلیک یا محلول در آب در زمانهای مختلف ایسکمی، به راحتی اکسید می‌شوند و ممکن است خط اول دفاع آنتی اکسیدانی در زمان پرفیوژن مجدد باشند؛ در حالی که آنتی‌اکسیدانهای لیپوفیلیک یا محلول در چربی مثل ویتامین E در این شرایط کاهشی نشان ندادند. آنها بعد از ایسکمی ۲۰ دقیقه‌ای، با القای یک استرس اکسیداتیو شدید با استفاده از تزریق H_2O_2، کاهش آنتی اکسیدانهای لیپوفیلیک را نیز گزارش کردند (۲۱). در سال ۲۰۰۰ نیز Conti و همکارانش در مدل ایسکمی- پرفیوژن مجدد در موش صحرایی، میزان تغییرات SOD، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و مالون- دی‌آلدئید را در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه اندازه‌گیری کردند. در مطالعه آنها تغییری در میزان مالون- دی آلدئید در دوره‌های مختلف ایسکمی مشاهده نشد اما میزان SOD، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (۱۴).

نتیجه‌گیری. نتایج این تحقیق نشان داد که در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد (۴۰ دقیقه ایسکمی دو طرفه کلیه و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد) مقدار GSH و SOD به طور معنی‌داری کاهش می یابد اما سطح ویتامین E پلاسما و بافت کلیه تغییری نمی‌کند. نکته مهمی که می‌توان از گزارش این تغییرات نتیجه گرفت این است که در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد (مانند شوک، بعد از اعمال جراحی و پیوند اعضا) یک رابطه منظم سیستماتیک بین آنتی‌اکسیدانها وجود دارد و بایستی یک الگوی خاص برای درمان با آنتی‌اکسیدانها در این شرایط در نظر گرفته شود.

www.SID.ir

Archive of SID

تقدیر و تشکر. این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران می باشد.

Refrences

1. Weight SC, Bell PR, Nicholson ML. Renal ischaemia-reperfusion injury. Br J Surgery 1996; 83:162-170.

2. Day BJ, Batinic-Haberle I, Crapo JD. Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. Free Radi Biol Med 1999; 26: 730–736.

3. Salvemini D, Riley DP, Cuzzocrea S. SOD mimetic is coming of age. Natu Rev 2002; 1: 367-374.

4. Sohal RS, Agarwal A, Agarwal S, Orr WC. Simultaneous overexpression of copper and zinc containing superoxide dismutase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential in Drosophila melanogaster. J Biol Chem 1995; 270: 15671–4.

5. Cnubben NH, Rietjens I, Wortelboer H, Zanden JV, Bladeren PJ. The interplay of glutathione related processes in antioxidant defense. Envir Toxi Pharm 2001; 10: 141-152.

6. Fryer MJ. Vitamin E as a protective antioxidant in progressive renal failure. Nephrology 2000; 5: 1-7.

7. Blatt DH, Leonard SW, Traber MG. Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. Nutrition 2001; 17: 799–805.

8. Zahmatkesh M, Kadkhodaee M, Arab HA, Shams S. Effects of co-administration of an iNOS inhibitor with a broad spectrum reactive species scavenger, in rat renal ischemia/reperfusion injury. Nephron Exp Nephrol 2006; 103 (3): 119-125.

9. Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia D, Favier A. Simultaneous determination of Retinol, α– tocopherol and β– carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography (HPLC). J Chromat 1991; 572: 03-116.

10. Peng YS, Peng YM. Simultaneous liquid chromatographic determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human buccal mucosal cells. Cancer Epidem Biomark Prev 1992; 1: 375-382.

11. Peng YM, Peng YS, Lin Y. A Nonsaponification method for the determination of carotenoids retinoids, and tocopherols in solid human tissues. Cancer Epidem Biomark Prev 1993; 2: 139-144.

12. Griffith OW. Determination of Glutathione and Glutathione disulfide using Glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem 1980; 106: 207-212.

13. Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. Methods Enzymol 1990; 186: 209-220.

14. Conti M, Eschwege P, Ahmed M, Paradis V, Droupy S, Loric S. Antioxidant enzymatic activities and renal warm ischemia: correlation with the duration of ischemia. Transplant Proc 2000; 32: 2740-1.

15. Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Center M, Cole SP, Deeley RG. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. Biol J 1996; 314: 433–437.

16. Rodrıguez-Reynoso S, Leal C, Buen EP, Castillo

www.SID.ir

Archive of SID

GC, Solano FR. Melatonin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury. J Surg Res 2004; 116: 242-247.

17. Chander V, Chopra K. Protective Effect of Nitric Oxide Pathway in Resveratrol Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. Arch Med Res 2006; 37:19–26.

18. Elsayed NM, Mustafa MG, Mead JF. Increased vitamin E content in the lung after ozone exposure: a possible vitamin E mobilization in response to oxidative stress. Arch Biochem Biophy 1990; 282: 263-269.

19. Copp RP, Wisniewski T, Hentati F, Larnaoutc A, Hamidac MB, Kaydena HJ. Localization of α-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. Brain Res 1999; 822: 80-87.

20. Hosomi A, Goto K, Kondo H, Iwatsubod T, Yokotae T, Ogawaa M. Localization of α-tocopherol transfer protein in rat brain. Neuros Lett 1998; 256: 159.

21. Haramaki N, Stewart DB, Aggarwal S, Ikeda H, Reznick AZ, Packer L. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. Free Rad Biol Med 1998; 25: 329-39.

www.SID.ir