میزان پراکسیداسیون چربی به دنبال انسداد شریان مزانتریک فوقانی در روده رت

Archive of SID

دکتر پریچهر پاس بخش[1*]
سارا سعید نیا[1]
دکتر فرید ابوالحسنی[1]
دکتر محمد نوری موگهی[1]
دکتر محمود مافی[1]
کبری مهران نیا[1]
دکتر علیقلی سبحانی[1]

1. بخش آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* تلفن: ۴۴۶۱۹۰۷۲،
پست الکترونیک: pasbakhsh@hotmail.com

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه، تعیین میزان پراکسیداسیون چربی و پروتئین بافتی به عنوان شاخصی از تخریب بافتی پس از ایسکمی و برقراری ری‌پرفیوژن به دنبال ایجاد آسیب القائی ناشی از انسداد شریان مزانتریک فوقانی در روده و بررسی اثر محافظتی هورمون ملاتونین به عنوان جمع کننده رادیکال آزاد و آنتی اکسیدان در رت می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه از ۳۶ سر رت نر نژاد Wistar – Albino با وزن بین ۱۲۰-۸۰ گرم که به طور مساوی به شش گروه تقسیم شده بودند و دوزهای مختلف ملاتونین (mg/Kg ۱۰، ۲۰، ۳۰) به صورت داخل عضلانی دریافت می‌کردند، استفاده شد. گروه یک: کنترل، گروه دو: sham که در این گروه عمل جراحی تا مرحله تشریح شریان مزانتریک فوقانی بر روی آنها انجام شد و حجم یکسانی از حلال به صورت داخل عضلانی به آنها تزریق گردید، گروه سه: ایسکمی-ری‌پرفیوژن، گروه چهار: ایسکمی- ری‌پرفیوژن به همراه ملاتونین با دوز ۱۰mg/Kg ، گروه پنج: ایسکمی- ری‌پرفیوژن به همراه ملاتونین با دوز ۲۰ mg/Kg و گروه شش: ایسکمی- ری‌پرفیوژن به همراه ۳۰mg/Kg بود.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که سطح ملان دی آلدئید (MDA) بافتی به طور معنی داری در گروه ۴، ۵ و ۶ از گروه ۳ پایین‌تر بود (P <۰/۰۵). سطح پروتئین بافتی در گروه ۴ نسبت به گروه ۳ به طور معنی‌داری بالاتر رفته بود (P < ۰/۰۰۱). سطح پروتئین بافتی در گروه‌های ۵ و ۶ نسبت به گروه ۳ اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

بحث: این مطالعه نشان داد که ملاتونین با دوز ۱۰mg/Kg، اثر آنتی اکسیدانی در جلوگیری از آسیب القائی ناشی از انسداد شریان مزانتریک فوقانی دارد.

کلمات کلیدی: پراکسیداسیون چربی، شریان مزانتریک فوقانی، ایسکمی، ری‌پرفیوژن، ملاتونین، ملان‌دی آلدئید

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

شریان مزانتریک فوقانی، شاخه‌ای از شریان آئورت می‌باشد که روده کوچک و بخشی از روده بزرگ تا حد فاصل دو سوم سمت راست کولون عرضی را خونرسانی می‌کند. هرگونه انسداد در خونرسانی و برقراری مجدد جریان خون (ری‌پرفیوژن) به دنبال رفع انسداد، باعث ایجاد آسیب بافتی در روده می‌شود. حالات و بیماری‌های مختلف باعث ایجاد حالت ایسکمی- ری‌پرفیوژن در این شریان می‌شوند. از جمله این موارد می‌توان به فتق گیر افتاده اشاره کرد.

به منظور ایجاد انسداد در شریان مزانتریک فوقانی، ایسکمی - ری‌پرفیوژن بر روی شریان انجام گرفت.

آسیب ایسکمی- ری‌پرفیوژن، شامل یک توالی از حوادث شیمیایی است که به عملکرد بد سلولی و نکروز منتهی می‌شود و از دو بخش تشکیل شده است.

۱ - *آسیب مستقیم*: آسیبی خفیف بوده و در طی مرحله ایسکمی ایجاد می‌شود. در این آسیب بافت و ارگان از خون محروم می‌شوند که در نتیجه مواد غذائی و اکسیژن ناکافی است.

۲ - *آسیب غیر مستقیم*: در طی ری‌پرفیوژن ایجاد می‌شود و شامل آسیب بافتی است که بعد از مرحله ایسکمی بیشتر از ده دقیقه و برقرار شدن دوباره جریان خون بوجود می‌آید. این آسیب شدیدتر از آسیب ناشی از ایسکمی می‌باشد. بیشترین آسیب ناشی از ایسکمی - ری‌پرفیوژن، در مرحله ری‌پرفیوژن شکل می‌گیرد و رادیکال‌های آزادی که در اکسیژن دهی مجدد بافت ایسکمی شده آزاد می‌شوند، مسئول آسیب بافتی ایجاد شده هستند [۲،۱].

آسیب القاء شده توسط ایسکمی- ری‌پرفیوژن، بوسیله تولید رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود [۳].

رادیکال‌های آزاد، به ترکیبات یونی گفته می‌شوند که دارای یک یا چند الکترون جفت نشده (منفرد) و بسیار فعال می‌باشند[۴]. به نظر می‌آید رادیکال‌های آزاد در اثر تجمع و انباشته شدن هیپوگزانتین در شرایط بی‌هوازی و نیز به وسیله نوتروفیل‌های فعال شده در بافت ایسکمیک تولید می‌شوند.

در طی زنجیره انتقال الکترون میتوکندریال، رادیکال‌های آزادی که باعث تحریک از بین رفتن پروتئین می‌شوند، تولید می‌گردند. آسیب پروتئینی اکسیداتیو ممکن است بوسیله فرایندهای متابولیک ایجاد شود.

آسیب پروتئین‌ها به دو صورت می‌باشد:

۱ - *آسیب غیر اختصاصی (Non-Specific (Global*: این آسیب به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده و منجر به قطعه قطعه شدن پروتئین و تغییر شکل تقریباً همه اسیدهای آمینه می‌شود.

۲ - *آسیب با محل معین (site - Specific (Localized* وقتی اتفاق می‌افتد که ROS [1] از قبیل هیدروکسیل OH^- در محل‌های اتصال یون‌های فلزی در پروتئین قرار می‌گیرد. وقتی این محل ها به وسیله مس یا آهن اشغال شوند، با H_2O_2 برای تولید هیدروکسیل (OH^-) که با اسیدهای آمینه ویژه موجود در مجاورت محل‌های اتصال متال که باعث آسیب ویژه Specific_Site می شوند، واکنش می دهند. این آسیب تغییرات ساختمانی وسیعی را نشان نمی‌دهد.

آسیب Site - Specific به صورت جزئی مورد مطالعه قرار گرفته که در زیر بیان می‌شود:

۱- یون‌های متال کاتالیتیک از قبیل آهن و مس، به مولکول‌های هدف مثل پروتئین، DNA یا غشاء سلولی متصل می‌شوند و هیدروکسیل (OH) که به وسیله O_2^- و H_2O_2 ایجاد می‌شود، در محل‌های اتصال مس یا آهن با مولکول‌های هدف واکنش می‌دهد.

۲ - اثرات آسیبی هیدروکسیل (OH) در محل ویژه‌ای که

1- Radical Oxygen Species

www.SID.ir

Archive of SID

یون‌های کاتالیتیک متصل هستند، مشاهده می‌شود.

۳ - عملکرد دفاعی جمع کننده‌های رادیکال آزاد برای برداشت هیدروکسیل (OH^-) از محل های ویژه، آسیب را کاهش می‌دهد. آرژنین - لیزین، سیستئین و پرولین به این نوع اکسیداسیون حساس هستند.

راه پیشگیری یا معالجهٔ صدمهٔ القاء شده توسط ایسکمی- ری‌پرفیوژن، به وسیله آنتی اکسیدان‌ها و پاک کننده‌های رادیکال آزاد و عوامل دیگر می‌باشد [۵، ۶].

ملاتونین، یک محصول مترشحه از غده پینه آل می باشد که بوسیله اثر بر روی هسته‌های سوپراکیاسماتیک، ریتم شبانه روزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و برای اولین بار توسط LERNER و همکارانش در سال ۱۹۵۸ کشف شد [۷].

ترکیب شیمیایی ملاتونین، N - استیل ۵ متوکسی تریپتامین[1] یعنی مشتقی از سروتونین که از تریپتوفان ایجاد می شود می‌باشد.

سروتونین ابتدا به وسیله N- استیلوترانسفراز[2] استیله می‌شود و سپس توسط هیدروکسی ایندول اورتومتیل ترانسفراز برای تشکیل ملاتونین، متیله می‌شود [۸].

قرار گرفتن در معرض نور، باعث مهار N - استیلو ترانسفراز شده و تولید ملاتونین را متوقف می‌کند.

قرار گرفتن در معرض تاریکی باعث انتقال پیام عصبی توسط نورون‌ها به هسته‌های سوپراکیاسماتیک می‌شود. از آنجا پیام عصبی به هسته‌های پارا ونتریکولار می‌رسد و از طریق عصب نخاعی توراسیک فوقانی به گانگلیون گردنی فوقانی می‌رود و به دنبال آن رشته‌های عصبی سمپاتیک به غده پینه آل رفته و نوراپی نفرین ترشح می‌شود. نور اپی نفرین در پینالوسیت‌ها توسط گیرنده‌های α و β آدرنرژیک دریافت می‌شود و باعث افزایش تولیدAMP حلقوی می‌شود و در مسیر سنتز ملاتونین باعث تبدیل سروتونین به ملاتونین می‌گردد. ملاتونین به خون و بطن‌های مغزی می‌ریزد و از بطن‌ها، وارد مایع مغزی نخاعی می‌گردد.

ملاتونین عملکردهای متعددی دارد که از آن جمله می‌توان به درمان بی‌خوابی و به تأخیر انداختن فرایند پیری اشاره کرد [۷].

ملاتونین فعالیت های فیزیولوژیک متعددی از قبیل عملکرد نوروآندوکرین و بلوغ جنسی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

علاوه بر آن، ملاتونین حاوی فعالیت آنتی اکسیدانی قوی می‌باشد که سلول‌ها و بافت‌ها و ارگان‌ها را از آسیب به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) محافظت می‌کند. همچنین ملاتونین رادیکال‌های آزاد را جمع‌آوری و از پراکسیداسیون چربی جلوگیری می‌نماید. سطوح مختلف ملاتونین بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی مثل SOD ، کاتالاز و گلوتاتیون را تحریک می‌کند و یا فعالیت آنها را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای مشخص شده که سطح mRNA ایزوفرم های SOD مثل mn-SOD و Cu,Zn-SOD را تا ۵۱ - ۳۵ ٪ بعد از تجویز ملاتونین افزایش می‌دهد [۹].

ملاتونین به دو روش در کاهش رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند:

۱ - به روش مستقیم نسبت به جمع آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن

۲ - به روش غیر مستقیم و از طریق عمل بر روی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بدن نسبت به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد از طریق این آنزیم‌ها اقدام می‌کند. [۱۰].

این رادیکال‌ها باعث آسیب اکسیداتیو می‌شوند که توانایی سلول را کاهش می‌دهد. همچنین رادیکالهای آزاد باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی شده که استفاده از داروهای آنتی اکسیدانی می‌تواند این ظرفیت را افزایش دهد [۱۱].

ملاتونین از طریق دادن الکترون، برای سم زدایی مستقیم رادیکال‌های آزادی مثل هیدروکسیل عمل می‌کند.

1- N-Acetyl-5 methoxy tryptamine
2- N-Acetyl o transferase

www.SID.ir

Archive of SID

ملاتونین از سلول، بافت و ارگان ضد آسیب اکسیداتیوی که به وسیله فرایندها و عوامل مختلف تولید رادیکال آزاد القاء می‌شود، محافظت می‌کند. ملاتونین در محافظت DNA هسته، چربی‌های غشا و پروتئین‌های سیتوپلاسم موثر بوده و ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی کل ارگانیزم را بهبود می‌بخشد. عملکرد ملاتونین به عنوان جمع کننده رادیکال آزاد و آنتی اکسیدان احتمالا مربوط به عبور آسان آن از سدهای بدن مثل سد خونی - مغزی (BBB) و وارد شدن آن به سلول و اندامک‌های سلولی می‌باشد [۱۲]. بدین ترتیب در مطالعه حاضر و با توجه به عملکرد ملاتونین، این ماده به عنوان یک آنتی اکسیدان وجمع کننده رادیکال‌های آزاد به دنبال ایسکمی- ری‌پرفیوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش بررسی

مطالعه روی ۳۶ سر رت نر از نژاد Wistar-Albino خریداری شده از انستیتو پاستور با وزن ۱۲۰ - ۸۰ گرم انجام گرفت. رت‌ها در قفس‌های جداگانه و در دمای ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بین ۸۰ - ۷۰ درصد قرار داده و به مدت ۱۲ ساعت در معرض نور قرار گرفته و با غذای استاندارد رت تغذیه شدند. ۱۲ ساعت قبل از آزمایش به آنها غذا داده نشد اما آب مصرف می‌کردند. بعد از اتمام کار، بدون هیچ محدودیتی غذا و آب در اختیار رت‌ها قرار گرفت. تمام روش‌های مطالعه بر روی حیوانات مطابق با قوانین NIH بود.

۳۶ سر رت را به شش گروه ۶ تایی به ترتیب زیر دسته‌بندی نمودیم:

گروه ۱: کنترل

گروه ۲: sham که عمل جراحی را تا تشریح شریان مزانتریک فوقانی انجام داده و حجم یکسانی از حلال‌ها را تزریق نمودیم.

گروه ۳: ایسکمی - ری‌پرفیوژن (I/R).

گروه ۴: I/R به همراه ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg

گروه ۵: I/R به همراه ملاتونین با دوز ۲۰ mg/kg

گروه ۶: I/R به همراه ملاتونین با دوز ۳۰ mg/kg

رت‌ها را قبل از شروع کار با ترازوی مخصوص وزن شده و برای بیهوشی با توجه به وزن آنها از کتامین ۱۰٪ و زیلازین ۲٪ (از شرکت Sigma) استفاده شد. کتامین با دوز ۵۰ mg/kg - ۴۰ و زیلازین با دوز ۵-۴ mg/kg به صورت داخل صفاقی (IP) به رت‌ها تزریق گردید.

رت را روی میز مخصوص عمل جراحی قرار داده و دست‌ها و پاها را با چسب در حالت اکستانسیون قرار داده و با محلول ضد عفونی کننده بتادین محل تراشیده شده ضد عفونی شد. سپس با استفاده از یک قیچی و پنس که قبلاً استریل شده بودند، پوست شکم رت در خط وسط از جناغ تا شانه به طوری که به صفاق آسیب وارد نشود، برش زده شد. سپس در طرفین با استفاده از یک قیچی نوک تیز پوست از صفاق جدا شد. در مرحله بعد با استفاده از قیچی و پنس صفاق نیز در خط وسط و در همان مسیر برش پوست باز شد تا محتویات شکم مشخص شود. سپس با استفاده از یک اکارتور، شکم کاملاً باز گردید.

با استفاده از دو پنس استریل روده‌ها به آرامی به سمت چپ کنار زده و در خط وسط و متمایل به چپ، ضربان شریان آئورت مشاهده شد. شریان مزانتریک فوقانی باید در بخش فوقانی شکم در سمت چپ هنگامی که از آئورت جدا شده و وارد مزانتر روده می‌شود پیدا کرد. ورید مزانتریک فوقانی نیز هم مسیر شریان و در سمت چپ شریان قابل رویت است.

طول شریان کوتاه و در حدود ۱ سانتی‌متر می‌باشد که در زیر صفاق خلف شکم قرار گرفته است. شریان با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از یک پنس از خلف صفاق جدا شده و آزاد گردید. برای بستن شریان از کلمپ‌های کوچک مخصوص عمل‌های جراحی مغز و اعصاب و آنوریسم استفاده شد. نبض جریان خون بعد از کلمپ کردن شریان در پشت کلمپ و ابتدای شریان مشاهده شد و همچنین قطع جریان خون در شاخه‌های جدا شده از مزانتریک فوقانی، در مزانتر روده دیده شد. شریان مزانتریک فوقانی برای مدت ۳۰ دقیقه در حالت کلمپ باقی ماند.

در این مدت برای این که روده‌ها در معرض هوا خشک نشوند و برای جلوگیری از چسبندگی آنها، یک گاز استریل را که با نرمال سالین ۰/۹ ٪ استریل مرطوب شده بود، روی شکم باز شده رت قرار داده شد تا رطوبت محل حفظ شود. درحین عمل بطور مرتب ضربان قلب و تنفس رت بررسی شد و با استفاده از یک چراغ حرارتی از کاهش درجه حرارت بدن رت جلوگیری گردید. بعد از اتمام ۳۰ دقیقه، کلمپ به آرامی با استفاده از اپلیکاتور از روی شریان برداشته و در این حال بازگشت مجدد جریان خون به روده کاملاً مشاهده شد. ملاتونین آماده شده برای رت‌ها را به صورت داخل عضلانی قبل از برداشتن کلمپ و بعد از برداشتن آن تزریق گردید. در مرحله بعد روده‌ها به آرامی در سرجای خودشان قرار داده و اکارتور برداشته و با استفاده از نخ سیلک ۰ - ۴، صفاق و پوست به همراه هم ترمیم گردید. محل بخیه را با استفاده از بتادین ضد عفونی کرده و رت‌ها به قفس مخصوص خودشان انتقال یافتند.

دوز سوم دارو در فردای روز عمل به صورت داخل عضلانی (IM) به رت‌ها تزریق شد. در روز سوم رت‌ها را با استفاده از دوز بالای کتامین کشته و متغیرهای مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

داروی ملاتونین ($O_{13}H_{16}N_2O_2$) مورد نیاز برای انجام این کار، از شرکت Sigma آمریکا تهیه شد. این دارو به صورت پودر شیری رنگ در ویال‌های تیره رنگ ۱۰۰ mg قرار دارد. پودر ملاتونین باید در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در جای تاریک و دور از نور نگهداری شود. برای استفاده از ملاتونین، باید به روش زیر و در شرایط استریل حل شود:

۴۸ میلی‌گرم ملاتونین در ۱ سی‌سی اتانول خالص حل شده و برای کاهش اثر و خاصیت سمیت اتانول، بوسیله نرمال سالین ۰/۹٪ (N/S) به نسبت ۱۰: ۱ رقیق گردید.

ملان دی آلدئید (MDA)، یکی از محصولات ناشی از پراکسیداسیون چربی توسط رادیکال‌های آزاد و به عنوان یک محصول مضر و خطرناک برای بافت می‌باشد. در این مطالعه برای بررسی اثر مفید ملاتونین برای حذف رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون چربی متعاقب آن، این فاکتور اندازه‌گیری شد.

با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید [۱۳]. می‌توان آلدئیدهای حاصله از پراکسیداسیون بافتی را اندازه‌گیری نمود. در این روش آلدئیدهای حاصله از پراکسیداسیون پپتیدی که با TBARs نمایش داده می‌شوند (اکثراً MDA)، با تیو باربیتوریک اسید در PH اسیدی و دمای بالا واکنش داده و ایجاد یک کمپلکس رنگی می‌کند که دارای قابلیت جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (nm) می‌باشد.

پروتئین، یکی از اجزاء مهم سلول و غشاء سلولی است که رادیکال‌های آزاد باعث از بین رفتن آنها می‌شوند و میزان آن را در بافت کاهش می‌دهند. در این مطالعه به بررسی اثر ملاتونین به عنوان یک جمع کننده رادیکال های آزاد و کاهش تخریب پروتئین سلولی متعاقب آن پرداخته می‌شود.

با استفاده از کیت پروتئین ادرار شرکت شمیم آنزیم، غلظت پروتئین اندازه گیری گردید. اساس آزمایش در این کیت بر واکنش Pyrogallal red با پروتئین در مجاورت با مولیبیات و شرایط اسیدی می‌باشد، که کمپلکس رنگی ایجاد شده در طول موج ۶۰۰ نانومتر (nm) دارای بیشترین جذب است.

www.SID.ir

Archive of SID

به منظور بررسی نتایج آزمایش‌های صورت گرفته در این مطالعه برای متغیرهای ملان دی آلدئید (MDA) و پروتئین بافتی، از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA و t-test) استفاده شد و اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف را بوسیله تست Tukey بررسی شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه، داده‌های بدست آمده از ملان دی آلدئید بافتی (MDA) به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی و بررسی اثر ملاتونین بر روی این شاخص نشان داده که میزان MDA بافتی در گروه ایسکمی - ری‌پرفیوژن (I/R) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) افزایش یافته بود. میزان MDA بافتی در گروه‌های تحت درمان با ملاتونین با دوز ۱۰،۲۰،۳۰ mg/kg نسبت به گروهI/R به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) کاهش یافته بود (جدول ۱).

جدول۱- تغییرات میزان ملان دی آلدئید بافتی (MDA) روده در گروه های تحت مطالعه

میزان	گروه			mg/kg ملاتونین		
MDA(µg/µl) (Mean±SE)	کنترل	Sham	I/R	۱۰	۲۰	۳۰
Mean	۰/۸۱۷۸	۱/۳۵۳	††۲/۵۸۰	*۱/۳۱۴	*۱/۴۱۹	*۱/۶۸۶
SE	۰/۲۸۱۸	۰/۳۵۷۰	۰/۳۲۰۳	۰/۲۶۳۹	۰/۰۷۰۶۰	۰/۱۴۴۷

* اختلاف معنی‌دار با گروه I/R دارد (P< ۰/۰۵).

††اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دارد (P< ۰/۰۱).

با نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، داده‌های بدست آمده از بررسی پروتئین بافتی در روده نشان داد که میزان پروتئین بافتی در گروه I/R در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود (P<۰/۰۰۱). بین گروه Sham و کنترل اختلاف معنی داری وجود نداشت (P> ۰/۰۵). میزان پروتئین بافتی در گروه تحت درمان با ملاتونین با دوز ۱۰mg /kg نسبت به گروه I/R به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود (P< ۰/۰۰۱). بین میزان پروتئین بافتی در گروه‌های تحت درمان با ملاتونین با روزهای ۲۰ mg /kg – ۳۰ در مقایسه با گروه I/R اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P > ۰/۰۵) (جدول۲).

جدول۲- تغییرات میزان پروتئین بافتی در روده در گروه های تحت مطالعه

(mg/dl)	کنترل	Sham	I/R	mg/kg ملاتونین		
				۱۰	۲۰	۳۰
Mean	۱۵/۳۳۳	۱۲/۸۳۳	†††۴/۳۹۰	۱۵/۳۲۴***	۶/۸۵۳	۵/۳۶۵
± SE	۱/۵۵۴	۳/۰۴۰	۰/۸۴۸۲	۲/۹۶۹	۱/۰۹۷	۱/۱۷۶

*** : اختلاف معنی دار با گروه I/R دارد (P<۰/۰۰۱).

†††اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دارد (P< ۰/۰۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

مطالعات انجام شده توسط Galat و همکارانش در سال ۱۹۹۰ و Wang همکارانش در سال ۲۰۰۳ ، Ozkan و همکارانش در سال ۲۰۰۴ و Hauet و همکارانش در سال ۱۹۹۸، نشان دادند که رادیکال‌های آزاد در پاتوژنز آسیب القائی در I/R نقش دارند [۱۷-۱۴].

همچنین مطالعات متعدد انجام شده توسط Freeman در سال ۱۹۸۲ ، Mc Cord در سال ۱۹۸۵ ،Bhaskar در سال ۱۹۹۵و Sievert در سال ۲۰۰۳، نشان دادند که سیستم گزانتین اکسیداز و نوتروفیل‌های فعال شده، در تولید رادیکال‌های آزاد سمی و ایجاد آسیب در طی I/R نقش دارند [۲۱- ۱۸].

در فاز ایسکمی سیستم گزانتین اکسیداز، قطع جریان خون و کمبود اکسیژن منجر به متابولیسم غیرهوازی و کمبود انرژی و کاهش ATP و تجمع هیپوگزانتین در سلول‌های ایسکمی شده می‌شود. نبود انرژی، پمپ یونی ATPase غشاء سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به تجمع کلسیم و سدیم و آب در سلول و تورم آن می‌شود.

گزانتین دی هیدروژناز که یک آنزیم طبیعی بدن است، به گزانتین اکسیداز تبدیل می‌شود (بوسیلهٔ پروتئاز وابسته به کلسیم) [۲۰].

در فاز ری‌پرفیوژن، گزانتین اکسیداز، هیپوگزانتین را به گزانتین تبدیل می‌کند و همچنین تولید اسید اوریک، رادیکال‌های سوپر اکسید (O_2^-) و هیدروژن پراکسید (H2O2) می‌کند. این وضعیت منجر به پراکسیداسیون چربی و اکسید شدن پروتئین غشاء سلول می‌شود.

از سوی دیگر، نوتروفیل‌ها در طی ری‌پرفیوژن فعال شده و به بافت همبند مهاجرت می‌کنند. اکسیداسیون در نوتروفیل‌ها در طی ری‌پرفیوژن منجر به تولید گونه های فعال اکسیژن می شود. این ترشحات خارج سلولی سمی نوتروفیل‌ها، باعث پراکسیداسیون چربی و اکسیداسیون پروتئین غشاء سلول می‌شوند [۲۲].

مطالعه‌ای توسط Masuko و همکارانش در سال ۱۹۹۹، نشان داد که استفاده از مهار کننده های گزانتین اکسیداز (XO) از قبیل آلوپورینول یا اکسی پورینول، آسیب ناشی از I/R را کاهش می‌دهند [۲۳].

همچنین تحقیقات انجام شده توسط Hansen و همکارانش در سال ۱۹۹۵ وKazez و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داد که برداشت لکوسیت ها از سیستم گردش خون تا حد زیادی آسیب ناشی از I/R را کاهش می‌دهد [۲۴، ۲۵].

Bartlett عنوان کرد که آسیب ناشی از فاز ری‌پرفیوژن به علت مقادیر زیادی رادیکال آزاد، بسیار شدیدتر از فاز ایسکمی است [۲]. اما لزوم برقراری ری‌پرفیوژن برای نگهداری بافت ایسکمی قابل انکار نیست، چون از این طریق انرژی سلولی تأمین می‌شود و متابولیت‌های سمی برداشته می‌شوند [۲۵].

ملاتونین به عنوان یک محصول مترشحه از غده پینه آل می‌باشد که عملکردهای مختلفی از جمله خاصیت آنتی اکسیدانی دارد [۷]. ملاتونین یا به روش مستقیم رادیکال‌های آزاد را جمع‌آوری کرده و یا به روش غیرمستقیم و از طریق افزایش قدرت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بدن نسبت به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اقدام می‌کند [۱۰].

ملاتونین در محافظت DNA هسته و چربی‌های غشاء و پروتئین‌های سیتوپلاسمی مؤثر بوده و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ارگانیزم را بهبود می‌بخشد. عملکرد ملاتونین به عنوان جمع کننده رادیکال آزاد و آنتی اکسیدان احتمالاً مربوط به عبور آسان ملاتونین از سدهای بدن مثل سد خونی ـ مغزی (BBB) و وارد شدن آن به سلول و اندامک‌های سلولی می‌باشد [۱۲].

پر اکسیداسیون چربی یکی از آسیب‌های ناشی از رادیکال

www.SID.ir

Archive of SID

آزاد است. برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون چربی از شاخص MDA استفاده شد. MDA محصول نهائی پراکسیداسیون چربی می‌باشد.

در مطالعه ما مشخص شد که ملاتونین با دوز ۱۰mg/kg، میزان MDA بافتی را به طور معنی‌داری کاهش داده است. این یافته با مطالعات انجام شده توسط Atilla، Sener و همکارانشان و Ozturk و همکارانش در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد [۲۸- ۲۶]. تجویز ملاتونین با دوز ۲۰ mg/kg، تغییر معنی‌داری در میزان MDA ایجاد کرد، که این یافته با مطالعات انجام شده توسط Kazaz و Ozturk در سال ۲۰۰۰-۲۰۰۳ و Singh و همکارانش در سال ۲۰۰۲ مطابقت داشت [۲۵، ۲۸، ۲۹]. تجویز ملاتونین با دوز ۳۰ mg/kg، تغییر معنی‌داری در میزان MDA بوجود آورد.

این یافته‌ها نشان داد که تجویز ملاتونین با دوز ۳۰mg/kg و۲۰و ۱۰ می‌تواند میزان MDA را کاهش دهد و از آسیب ایسکمی - ری‌پرفیوژن بکاهد. آسیب به پروتئین یکی از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد در طی ایسکمی- ری‌پرفیوژن می‌باشد. این آسیب به دو صورت Global و Localized در پروتئین ایجاد می‌گردد.

مطالعه انجام شده توسط Kahraman و همکارانش در سال ۲۰۰۳، نشان داد که رادیکال آزاد باعث اکسیداسیون پروتئین می‌شود، این یافته با مطالعه ما که نشان داد رادیکال آزاد ناشی از ایسکمی- ری‌پرفیوژن باعث اکسیداسیون پروتئین می‌شود و میزان آن در گروه ایسکمی- ری‌پرفیوژن نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته، مطابقت دارد [۲۲].

مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳ توسط Recio و همکارانش نشان داد که ملاتونین با دوز mg/kg ۱۰، اکسیداسیون پروتئین ناشی از آدریومایسین را کاهش می‌دهد. تحقیق ما نیز نشان داد که تجویز ملاتونین با دوز mg/kg ۱۰، می‌تواند اکسیداسیون پروتئین را به طور معنی‌داری نسبت به گروه ایسکمی- ری‌پرفیوژن کاهش دهد [۳۰].

ملاتونین با دوز mg/kg ۳۰-۲۰، تغییر معنی‌داری را در اکسیداسیون پروتئین نسبت به گروه ایسکمی- ری‌پرفیوژن نشان نداد.

مطالعه فوق نشان داد که انسداد شریان مزانتریک فوقانی به دنبال ایسکمی- ری‌پرفیوژن، باعث ایجاد آسیب به چربی و پروتئین بافتی می‌شود. تجویز ملاتونین با دوز ۱۰mg/kg به طور معنی‌داری منجر به کاهش میزان MDA و افزایش پروتئین بافتی می‌گردد.

تجویز ملاتونین با دوز ۲۰mg/kg تغییر معنی‌داری در میزان MDA بافتی بوجود آورد اما تغییر معنی‌داری در میزان پروتئین ایجاد نکرد. تجویز ملاتونین در دوز ۳۰mg/kg، به طور معنی‌دار میزان MDA بافتی را کاهش داد ولی تغییر معنی‌داری در میزان پروتئین بوجود نیاورد.

www.SID.ir

References

Archive of SID

1. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischemia -reperfusion injury to the intestine. *Aust NZJ Surg* 1998; 68: 554-61.
2. Bartlett RL. Leukocyte mediated reperfusion injury: What role HBO? Richard Hyperbaric Health Center [serial on line] 1996 [cited 2006 sep26]; [www.richmond-hyperbaric.com/RHHC. Reperfusion.htm]
3. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-72.
4. Schlondroff D, Ardaillou R. Prostaglans other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney Int* 1986; 29: 108-119.
5. Sinatra ST, De Macro J. Free radicals , Oxidative stress, Oxidized low density lipoprotein (LDL) and the heart:antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn Med* 1995; 59: 579-88.
6. Haramaki N, Stewart DB, Aggarwal S. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by Ischemia – reperfusion. *Free Radi Biol Med* 1998; 25: 329-339.
7. K. Hempel:Melatonin. The health gazette1996: 2
8. Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: A Review of the science. *Med scape General Medicine* 2004; 6: 1–14.
9. Reiter JR, Tan DX, Exuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduct-ion of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444–458.
10. Reiter RJ, Tan D, Mayo JC, Sainz RM, Leon L, Czarnocki Z. Melatonin as antioxidant: biochemical mechanisms and patholphysiological implications in humans. *Acta Biochemica Polonica* 2003; 50: 1129–1146.
11. Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ, Tricaud Y, Martin M, Holfschir D, et al. Radiationinduced cutaneo-muscular fibrosis (III):major therapeutic efficacy of liposomal Cu/Zn superoxide dismutase. *Bull Cancer* 1993; 80: 799-807.
12. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz– Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxy-gen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255–2271.
13. Esterbauer H, Cheesman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products. Malonaldehyde and 4– hydroxy non nenal. *Meth Enzymol* 1990; 186: 407–421.
14. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS. Postischemic renal dysfunction: the limited role of xanthine oxidase-generated oxygen free radicals. *J Surg Res* 1990; 49: 488-492.
15. Wang J, Huang YW, Wei JH, Wei TX, Dong JZ, Zhang JY. Protective effect of trimetazidine on rabbit myocardium during ischemiare-perfusion. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003; 32: 219–22.
16. Ozkan KU, Boran C, Killinc M, Garipardic M, Kurutas EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia– reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsiondetorsion. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 91–5.
17. Hauet T, Baumert H, Mothes D, Germonvill T. Lipid peroxidation after cold storge and normothermic reperfusion: the effect of trimetazidine. *Transpl Int* 1998; 11: 408–409.
18. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412–426.
19. Mc Cord JM. Oxygen – derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* 1985; 312: 159–163.
20. Bhaskar L, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical–induced damage during eolonic ischemiat reperfusion in rats. *Mol Cell Biochem* 1995; 151: 9–14.
21. Sievert A. Leukocyte depletion as a mechanism for reducing neutrophil – mediated ischemic-reperfusion injury during transplant-tation. *Jextra Corpor Technol* 2003; 35: 48–52.
22. Kahraman A, Erkasap N, Serteser M, Koken T. Protectective effect of quercetin on renal

www.SID.ir

Archive of SID

ischemia/reperfusion injury in rats. *J nephrol* 2003; 16: 219-224.

23. Masuko T, Saski L, Funayama Y, Naito H. Direct measurement of phosphtidylcholine hydroperoxide discloses the mechanism of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *The socie-ty for surgery of the alimentary tract* 1999; 4: 5.

24. Hansen PR. Role of Neutrophils in myoca-rdial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91: 1872-1885.

25. Kazez A, Demirba M, Ustunda B, Ozercan BH. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia – reperfusion injury in rats. *J Pediatric Surgery* 2000; 35: 1444–1448.

26. Sener G, Sehirli AO, Keyer Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res* 2002; 32: 120-6.

27. Atilla S, Rahmi O, Sezai O, Irfon O. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experim-entally induced left varicocele. *Neuroendocr-inology letters* 2003; 24: 86-90.

28. Ozturk A, Baltaci A, Mogulkoc R, Ozturk B. The effect of prophylactic melatonin admin-istration on reperfusion damage in experimental testis ischemia-reperfusion. *Neuroendocrinology letters* 2003; 24: 170-2.

29. Singh P, Bhargava VK, Garg SK. Effect of melatonin and beta – carotene on indomethacin induced gastric mucosal injury. *Indian J Physiol Pharmacol* 2002; 46: 229–34.

30. Recio Pascual J M: Current view of the pineal gland. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina* 2003; 120: 337–51.

www.SID.ir