

تأثیر تجویز سولفات منیزیم بر عملکرد کلیه متعاقب القا

ایسکمی - باز خونرسانی در موش صحرایی

• نگین جمشیدی

دانش آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

• احمد اصغری (نویسنده مسئول)

گروه جراحی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

• مهرداد نشاط

گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

• پژمان مرتضوی

گروه پاتولوژی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۹۴ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۴

Email: dr.ahmad.asghari@gmail.com



چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر پیشگیری کننده تجویز سولفات منیزیم بر عملکرد کلیه متعاقب ایسکمی - باز خونرسانی تجربی در موش صحرایی انجام گرفت. در این مطالعه از ۲۵ سحر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار استفاده شد که بصورت تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول (شاهد جراحی): در این گروه آب مقطر گاواژ شده و پس از گذشتن یک هفته، محوطه بطنی حیوانات باز شده و نفرکتومی کلیه چپ انجام گرفت. گروه دوم (ایسکمی - رپرفیوژن IR): این گروه تا زمان ایجاد ایسکمی باز خونرسانی هیچ دارویی دریافت نکرده و بعد از یک هفته محوطه بطنی آنها باز و عروق کلیه‌ها توسط پنس غیرضربه‌ای بسته و بعد از ۴۵ دقیقه آزاد شد و ۸ ساعت بعد از آن نفرکتومی کلیه چپ صورت گرفت. گروه سوم: یک هفته قبل از القا ایسکمی، سولفات منیزیم (۲۵mg/kg) گاواژ شد و بعد از یک هفته محوطه بطنی آنها باز شد، عروق کلیه‌ها توسط پنس غیرضربه‌ای بسته و بعد از ۴۵ دقیقه آزاد گردید و ۸ ساعت پس از آن، نفرکتومی کلیه چپ صورت گرفت. مراحل کار در گروه‌های چهارم و پنجم مشابه گروه سوم انجام گرفت با این تفاوت که موش‌ها به ترتیب سولفات منیزیم (۵۰mg/kg) و (۱۰۰mg/kg) را دریافت کردند. در انتهای آزمایش نمونه‌های بافتی برای ارزیابی آسیب‌شناسی و اندازه‌گیری فعالیت مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز اخذ شد. نتایج حاصل از آسیب‌شناسی کلیه نشان داد که میزان نکروز و دژنراسیون لوله‌های ادراری و ارتشاح سلول‌های التهابی در گروه‌های پیش‌درمان شده با سولفات منیزیم در مقایسه با گروه‌های درمان نشده، پایین‌تر بود. همچنین تیمار با سولفات منیزیم (۱۰۰mg/kg) بطور معنی‌داری مقادیر افزایش یافته مالون دی‌آلدئید بافت کلیه را کاهش داد و مقادیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز کاهش یافته کلیه را افزایش داده بود ($p < 0.05$). نتایج تحقیق نشان داد که سولفات منیزیم توانسته است از آسیب‌های وارده به کلیه متعاقب القا ایسکمی - باز خونرسانی جلوگیری کند...

کلمات کلیدی: کلیه، ایسکمی - باز خونرسانی، سولفات منیزیم، موش صحرایی

- Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 63-75

Effects of magnesium sulfate administration on ischemia-reperfusion kidney in rat

By: Jamshidi, N., Veterinary Graduate Student, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Asghari, A., (Corresponding Author) Department of Veterinary Surgery, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Neshat, M., Department of Veterinary Clinical Science, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. Mortazavi, P., Department of Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 2016-07-07 Accepted: 2016-08-15

Email: dr.ahmad.asghari@gmail.com

This study designed to determine protective effect of magnesium sulfate on kidney function followed by ischemia-reperfusion in rat. A total 25 Wistar male rat randomly divided into 5 experimental groups (n=5). Control group: had no received medicine and gavage water for 1 week, then peritoneum opened and left kidney nephrectomy was created. The IR group: not received medicine until ischemia-reperfusion, the peritoneum opened and the renal ischemia done using clamp for 45 min, then 8 h later left nephrectomy was done. Group 3: received magnesium sulfate (25 mg/kg) for 1 week, then peritoneum opened and the renal ischemia done using clamp for 45 min, then 8 h later left nephrectomy was done. Groups 4 and 5 were similar to group 3, except rats received 50 and 100 mg/kg of magnesium sulfate, respectively. At the end of the study, tissue samples collected for histopathological evaluation and malondealdehyde, Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase levels. According to the results, the necrosis and degeneration of the nephrons was lower in magnesium sulfate treated groups compared to control grouse. Also, administration of magnesium sulfate (100 mg/kg) significantly normalized the elevated levels of malondealdehyde and increased Superoxide dismutase and Glutathione peroxidase levels ($P < 0.05$). These results suggest magnesium sulfate diminished ischemia-reperfusion injury in kidney in rat.

Key words: Kidney, Ischemia-reperfusion, Magnesium sulfate, Rat

مداخلات مثل انسداد مسیرهای تولید رادیکال‌های آزاد، استفاده از داروهای ضدالتهاب جهت کاهش آسیب پیش‌نهاده شده است (۱۹). مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانت و جمع‌کننده رادیکال‌های آزاد بر روی آسیب ناشی از فرآیند ایسکمی - بازخونسازی دارای اثرات محافظتی هستند (۲۴، ۲۸).

منیزیم یک یون ضروری است که برای فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها لازم است؛ این آنزیم‌ها شامل آنزیم‌های درگیر در متابولیسم گلوکز مانند هگزوکیناز، فسفوفروکتوکیناز، آلدولاز، فسفولیسیرات کیناز و پیروات کیناز، سنتز و شکست اسیدهای چرب و متابولیسم پروتئین و DNA می‌باشند. منیزیم به صورت اولیه یک کاتیون درون سلولی است که هم به پروتئین متصل و هم با آنیون‌ها ترکیب شده و هم به صورت آزاد می‌باشد. منیزیم غیرمتصل مانند منیزیم یونیزه، به عنوان یک فرم فعال از نظر بیولوژیکی در نظر گرفته می‌شود (۶). منیزیم می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل کند و منیزیم میزان تولید آنزیم خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش داده (۱) درحالی که کاهش منیزیم حساسیت سلولی به تخریب اکسیداتیو را افزایش داده (۹)

مقدمه

نارسایی حاد کلیه ایسکمیک یک سندرم بالینی است که به دنبال قطع یا کاهش جریان خون کلیه ایجاد می‌شود، علیرغم اقدامات پیشگیرانه و درمانی هنوز این بیماری با مرگ و میر بالایی همراه است (۱۴). ایسکمی کلیوی حادثه مهمی است که معمولاً می‌تواند متعاقب پیوند کلیه، همی نفرکتومی، شوک هموراژیک و بسیاری از بیماری‌های دیگر رخ دهد (۴). بازگشت مجدد جریان خون به دنبال فاز اولیه ایسکمی، موج جدیدی از آسیب را در عضو به بار می‌آورد (۲۷، ۲۵، ۱۲، ۷). آسیب ایسکمیک - بازخونسازی کلیوی علت اصلی نارسایی حاد کلیه را تشکیل می‌دهد (۱۷). برقراری مجدد جریان خون سبب فراهم‌آوردن میزان زیاد اکسیژن برای آن ارگان می‌شود. این افزایش غلظت اکسیژن سبب فعال‌سازی ماکروفاژها در دیواره عروق شده و به دنبال آن رادیکال‌های آزادی همچون سوپراکسیداز تولید می‌شود (۳۰، ۲۲، ۱۵، ۷). مرگ سلولی به دنبال آسیب ایسکمیک - بازخونسازی کلیوی در ارتباط نزدیک با تولید رادیکال‌های آزاد و لیپید پراکسیداسیون ناشی از آن می‌باشد (۲۰). گرچه درمان قطعی برای جلوگیری از آسیب ایسکمیک - بازخونسازی پیدا نشده، ولی اخیراً پاره‌ای

سایر گروه‌ها آب مقطر گاواژ و پس از یک هفته، محوطه بطنی آنها باز و نفرکتومی کلیه چپ انجام گرفت. گروه دوم (IR): این گروه تا زمان ایجاد ایسکمی بازخونسازی هیچ دارویی دریافت نکرده و بعد از یک هفته محوطه بطنی آنها باز و عروق کلیه‌ها توسط پنس غیرضربه‌ای بسته و بعد از ۴۵ دقیقه آزاد شد و ۸ ساعت بعد از آن نفرکتومی کلیه چپ صورت گرفت. گروه سوم: یک هفته قبل از القا ایسکمی، سولفات منیزیم (۲۵mg/kg) گاواژ شد و بعد از یک هفته محوطه بطنی آنها باز شد، عروق کلیه‌ها توسط پنس غیرضربه‌ای بسته و بعد از ۴۵ دقیقه آزاد گردید و ۸ ساعت پس از آن، نفرکتومی کلیه چپ صورت گرفت. مراحل کار در گروه‌های چهارم و پنجم مشابه گروه سوم انجام گرفت با این تفاوت که موش‌ها به ترتیب سولفات منیزیم (۵۰mg/kg) و (۱۰۰mg/kg) را دریافت کردند.

نحوه جراحی

بعد از گذشت یک هفته از خوراندن داروها، تمامی حیوانات توسط داروهای کتامین هیدروکلراید (ساخت شرکت آلفاسان هلند) (۶۰mg/kg) و زایلازین (ساخت شرکت آلفاسان هلند) (۱۰mg/kg) با تزریق داخل صفاقی بیهوش شده و ناحیه خط وسط شکم برای انجام جراحی تراشیده و اسکراب گردید و برای جراحی آماده شد. جهت جلوگیری از پائین آمدن دمای بدن حیوانات از تشک برقی مخصوص استفاده شد. جهت ایجاد ایسکمی رپرفیوژن، خط میانی شکم برش داده شد، سپس عروق کلیوی توسط پنس غیر ضربه ای (Non-traumatic) بسته شده و بعد از ۴۵ دقیقه آزاد گردید (۲۹). جهت مرطوب نگاه داشتن ناحیه، از تامیون خیس شده با نرمال سالین گرم استریل استفاده شد. سپس پنس‌ها برداشته شده و خط میانی شکم طبق روش‌های متداول بخیه گردید. پس از گذشت ۸ ساعت، محوطه بطنی باز شده و کلیه سمت چپ نفرکتومی گردیده و بلافاصله به محلول فرمالین ۱۰ درصد منتقل شد و جهت رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین و انوزین به آزمایشگاه پاتولوژی ارسال گردید. همچنین نمونه‌های بافتی برای تعیین مقادیر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اخذ شد (۲۶). درجه بندی پاتولوژی طبق جدول زیر انجام گرفت.

و موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در مطالعات سلولی می‌شود (۸). با توجه به تاثیر بسزای رادیکال‌های آزاد در ایجاد آسیب‌های ایسکمی-بازخونسازی به نظر می‌رسد که سولفات منیزیم با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تاثیر بر پیش‌سازهای التهابی در کاهش آسیب‌های ایسکمی-بازخونسازی موثر باشد. از این‌رو در مطالعه حاضر به ارزیابی اثرات سولفات منیزیم بر عملکرد کلیه متعاقب القای آسیب ایسکمی-بازخونسازی در کلیه موش صحرایی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد استفاده

در این مطالعه از ۲۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار و سالم با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که بصورت تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. موش‌ها از بخش تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه و در قفس‌های مخصوص واقع در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران نگهداری شدند. به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن حیوانات با محیط، هیچگونه آزمایشی به مدت یک هفته روی موش‌ها صورت نگرفت و تمامی حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه‌ای یکسان (دما، رطوبت، نور، نوع جیره غذایی و تعداد دفعات غذای یکسان) نگهداری شدند و در چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. تغذیه موش‌ها با استفاده از پلت آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت و آب نیز بصورت مصرف آزاد با استفاده از آب لوله کشی شهری تامین شده است و در اختیار حیوانات قرار گرفت. پروتکل این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مورد تایید کمیته حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام گرفت.

گروه‌های مورد مطالعه

موش‌ها بصورت تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه اول (شاهد): موش‌های این گروه هیچ دارویی دریافت نکرده و مساوی با

جدول ۱- درجه بندی آسیب شناسی بافتی کلیه

امتیاز	تورم سلولی	نکروز	التهاب
-	عدم تورم سلولی	عدم نکروز	عدم التهاب
۱+	کمتر از ۲۵٪ لوله‌ها	کمتر از ۲۵٪ لوله‌ها	کمتر از ۲۵٪ بافت
۲+	بین ۲۵-۵۰٪ لوله‌ها	بین ۲۵-۵۰٪ لوله‌ها	بین ۲۵-۵۰٪ بافت
۳+	بین ۵۰-۷۵٪ لوله‌ها	بین ۵۰-۷۵٪ لوله‌ها	بین ۵۰-۷۵٪ بافت
۴+	وسیع و گسترده	وسیع و گسترده	وسیع و گسترده

اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی‌لیتر دی‌سدیم هیدروژن ۰/۸ و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۴ درصد به محلول شناور افزوده شد و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز به صورت میلی‌گرم پروتئین/دقیقه/میکرومول گلوکاتایون اکسید بیان گردید.

تحلیل آماری

برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS-۱۶ استفاده شد. اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی Kruskal Wallis Test مورد بررسی قرار گرفت. اختلافات در سطح ($p < 0/05$) معنی‌دار تلقی شدند.

نتایج

نتایج مربوط به آسیب شناسی بافتی گروه‌های مختلف

بررسی هیستوپاتولوژیک نشان داد که نکروز و دژنراسیون لوله‌های دراری و نفوذ سلول‌های التهابی در گروه‌های درمان شده با سولفات منیزیم در مقایسه با گروه‌های درمان نشده پایین‌تر و خفیف بوده است (شکل ۱ تا ۱۰).

نتایج آنزیمی

اثرات درمان با سطوح مختلف سولفات منیزیم بر مقایسه بافتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کلیه موش‌های صحرایی متعاقب ایسکمی - بازخوردسانی در جدول ۳ آمده است. با توجه به نتایج، ایسکمی - بازخوردسانی موجب افزایش معنی‌دار مقادیر مالون‌دی‌آلدئید کلیه شد ($p < 0/05$). گواژ سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منیزیم اثر معنی‌داری بر مقادیر مالون‌دی‌آلدئید بافت کلیه نداشت ($p < 0/05$) اما تجویز سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منیزیم موجب کاهش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید بافت کلیه شد ($p < 0/05$).

در این مطالعه، کاهش معنی‌دار در مقادیر سوپراکسید دیسموتاز بافت کلیه متعاقب ایسکمی - بازخوردسانی مشاهده شد ($p < 0/05$). خوردن سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منیزیم اثر معنی‌داری بر مقادیر سوپراکسید دیسموتاز بافت کلیه نداشت ($p < 0/05$) اما سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منیزیم موجب افزایش معنی‌دار سوپراکسید دیسموتاز بافت کلیه شد ($p < 0/05$).

همانطور که در جدول ۳ مشخص است، ایسکمی - بازخوردسانی کلیه موجب کاهش معنی‌دار مقادیر کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز بافت کلیه شد ($p < 0/05$). خوردن سطوح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منیزیم موجب اثرات مفید بر مقادیر کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز بافت کلیه شد، هرچند تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه IR نبوده است ($p < 0/05$). گواژ سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منیزیم موجب افزایش معنی‌دار مقادیر کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز بافت کلیه نسبت به گروه IR شده است ($p < 0/05$).

بحث

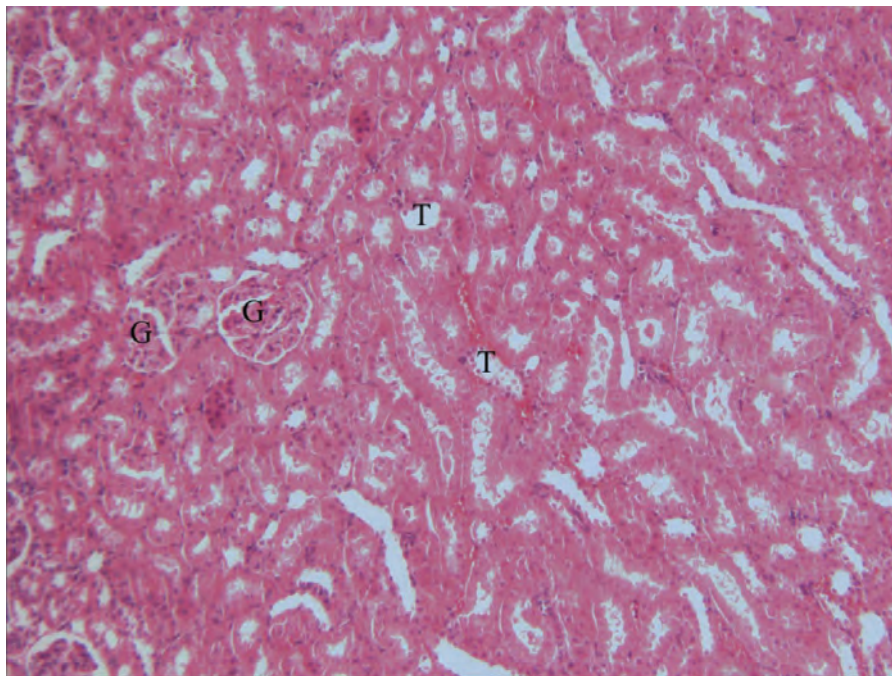
همانطور که دیده شد سولفات منیزیم مقادیر افزایش‌یافته مالون‌دی‌آلدئید بافت کلیه را کاهش و مقادیر سوپراکسید دیسموتاز،

فراسنجه‌های بیوشیمیایی

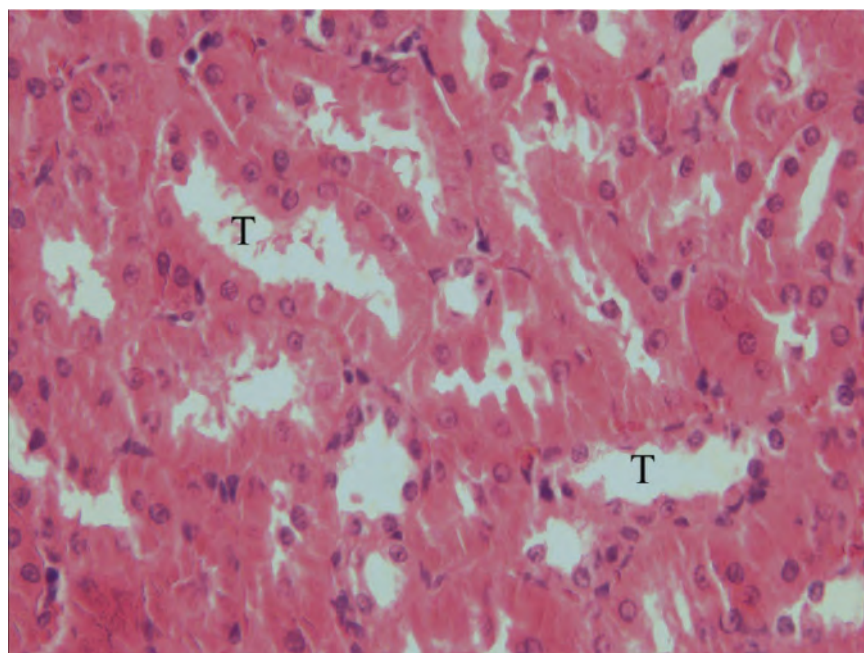
در انتهای آزمایش نمونه‌های کلیه چپ موش‌ها سریعاً خارج و در سالیین بسیار سرد شستشو و هموژنات ۱۰ درصد در ۱/۱۵ درصد (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول شناور جهت سنجش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde; MDA)، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (Catalase; CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه، میزان گلوکاتایون احیا و مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) انجام شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش Nishikimi و همکاران تعیین گردید (۱۸). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های کلیوی با بافر پیروفسفات سدیم، فنازین متوسولفات (phenazine methosulfate; PMT) و نیترو-بلو تترازولیوم (Nitro-blue Tertazolium; NBT) مخلوط گردید. واکنش با افزودن نیکوتین‌آمید-آدنین دی‌نوکلئوتید (Nicotinamide-adenine dinucleotide; NADH) آغاز شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگ‌زای تشکیل شده در ۵۶۰ nm اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز توسط روش Claiborne و بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ nm، مورد سنجش قرار گرفت (۳). به طور خلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۷M, pH=۰/۰۵)، ۱ میلی‌لیتر پرکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ M) و ۰/۰۵ میلی‌لیتر PMS (۱۰ درصد) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب در ۲۴۰ nm اندازه‌گیری شد. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه گردید.

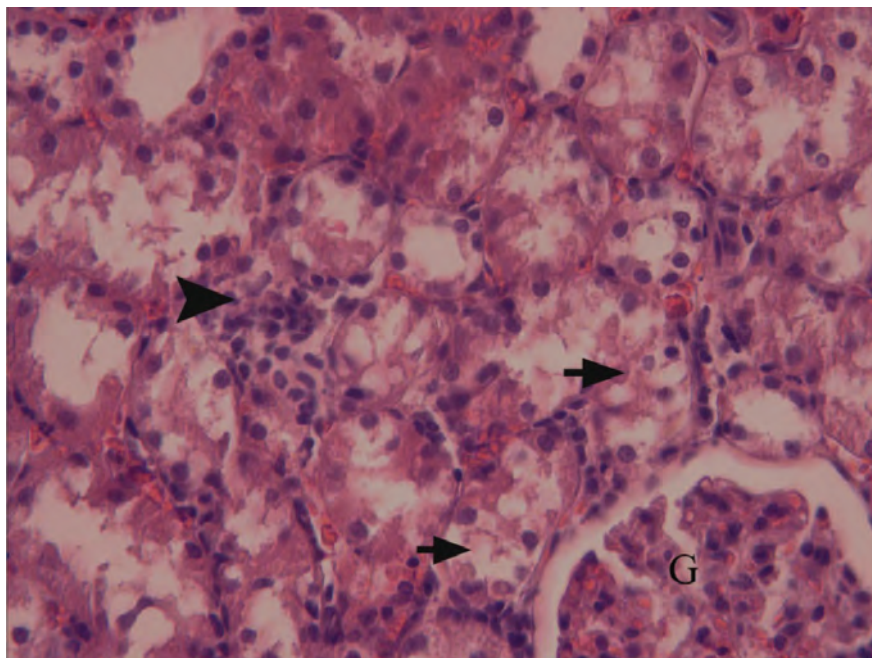
فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با استفاده از روش Rotruck و همکاران (۱۹۷۳) و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (۲۳).
(گلوکاتایون اکسید) $H_2O + GSSG + 2H_2O$ (گلوکاتایون احیاء) $\rightarrow 2GSH + H_2O_2$
گلوکاتایون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوکاتایون را اکسیده کرده که به طور هم‌زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوکاتایون باقی‌مانده توسط محلول دی‌تیوبیس نیتروبنزوئیک اسید (Dithiobis nitrobenzoic acid; DTNB) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنش گر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر اتیلن دی‌آمین تترا-استیک اسید (۰/۸، ۰/۱ ethylenediamine tetra-acetic acid; EDTA) میلی‌لیتر آزید سدیم (۰/۱۰ mM sodium azide)، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵ و ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک



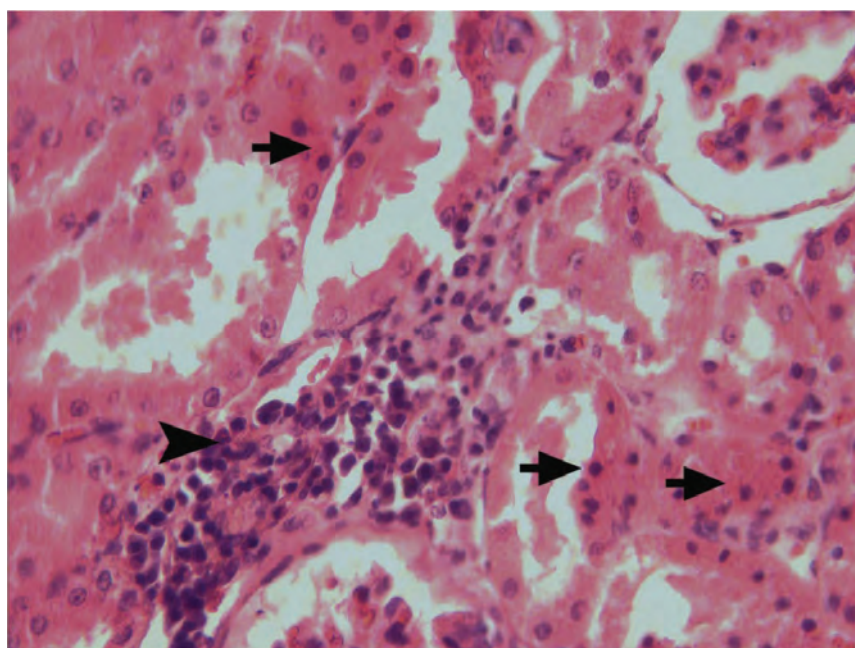
شکل ۱- کلیه در گروه شاهد، گلومرول‌های مالپیگی (G) و لوله های ادراری (T) بصورت طبیعی دیده می شوند (H&E*10)



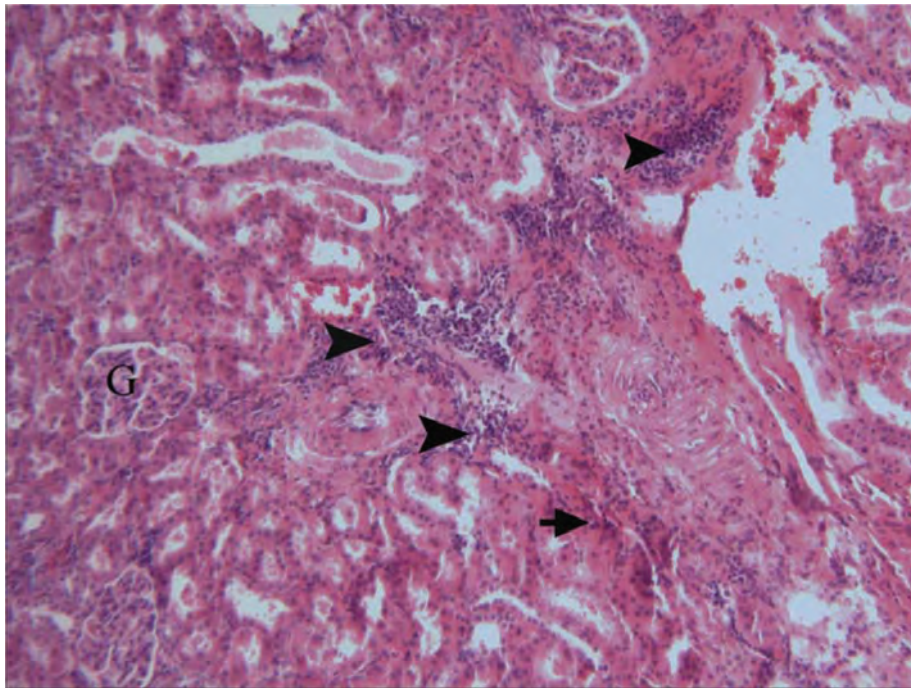
شکل ۲- کلیه در گروه شاهد، لوله های ادراری (T) بصورت طبیعی دیده می شوند (H&E*40)



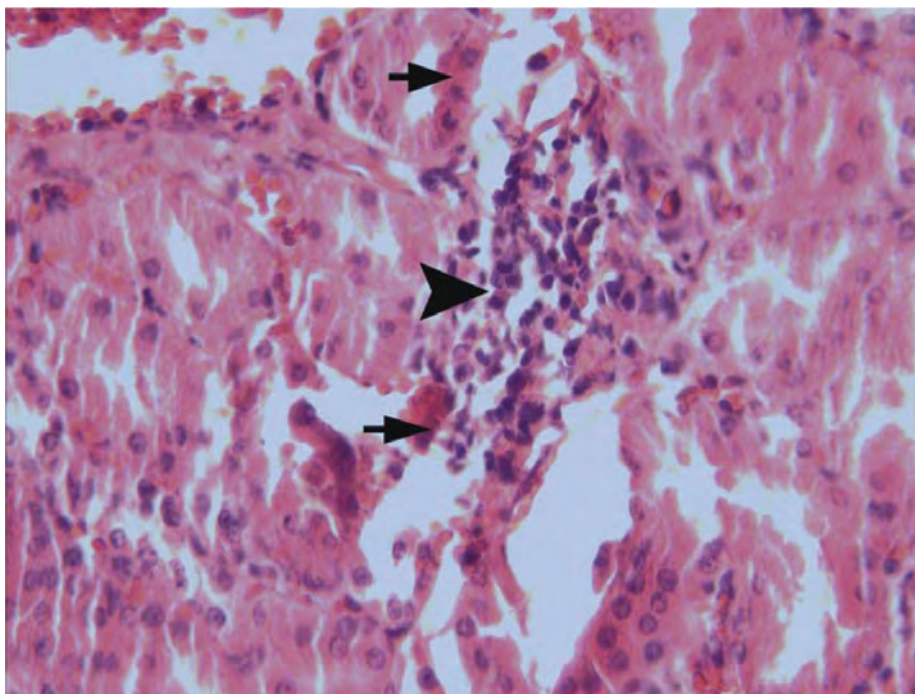
شکل ۳- کلیه در گروه IR، گلوبرولهای مالپیگی (G)، دژنراسیون لوله های ادراری (پیکان) و نفوذ سلولهای التهابی (نوک پیکان) دیده می شوند (H&E*10)



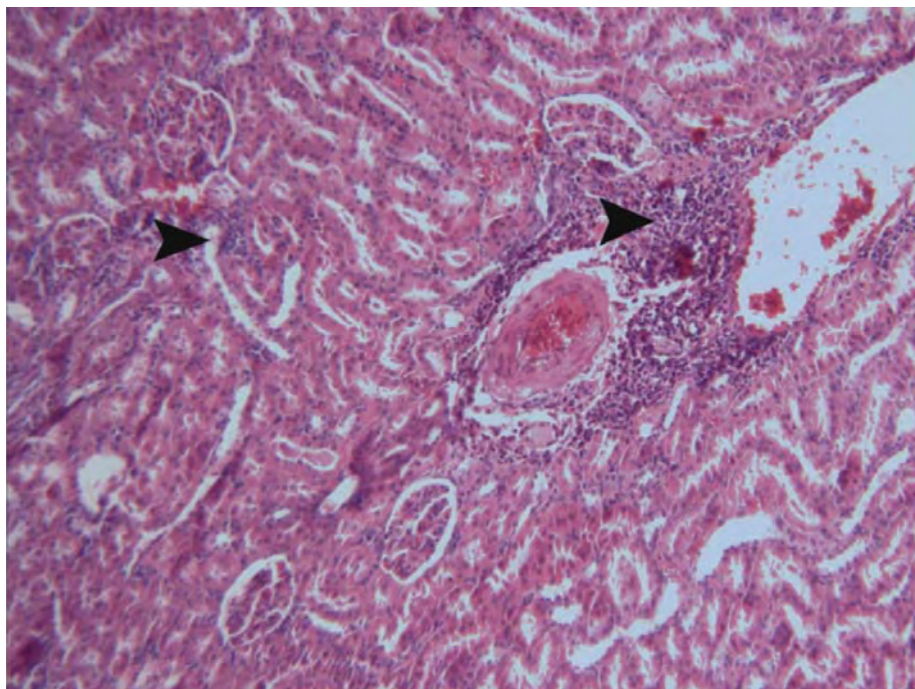
شکل ۴- کلیه در گروه IR، نکروز لوله های ادراری (پیکان) و نفوذ سلولهای التهابی (نوک پیکان) دیده می شوند (H&E*40)



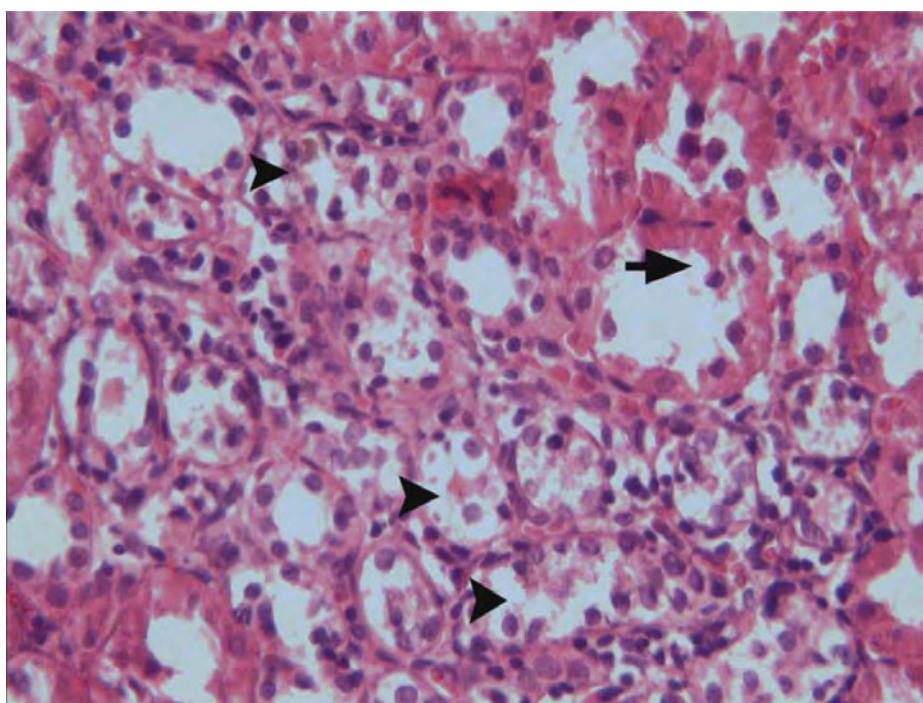
شکل ۵- کلیه در گروه سوم، گلومرولهای مالپیگی (G)، نکروز لوله های ادراری (پیکان) و نفوذ سلولهای التهابی (نوک پیکان) دیده می شوند (H&E*10)



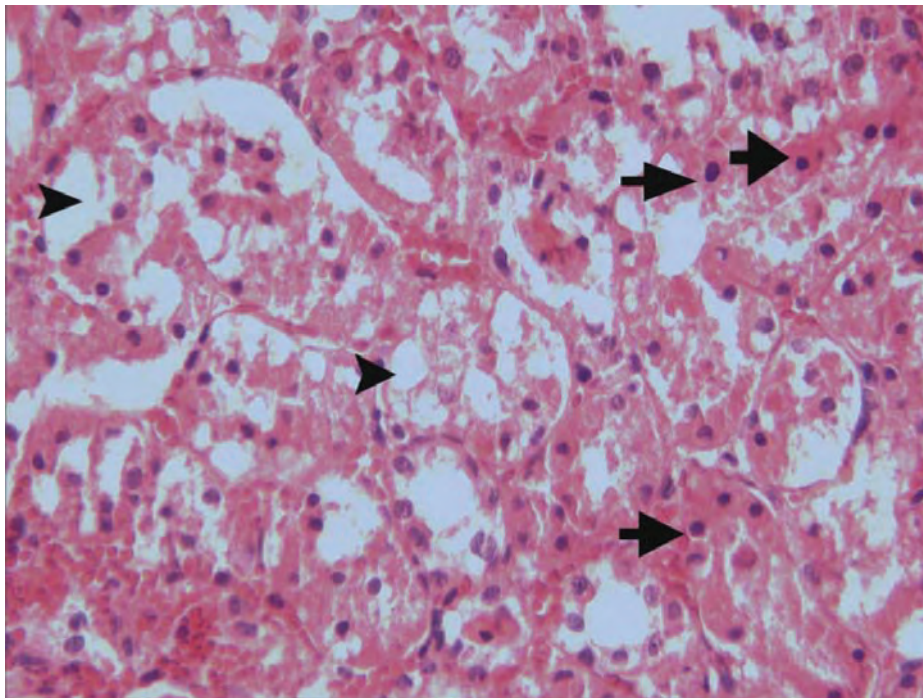
شکل ۶- کلیه در گروه سوم، نکروز خفیف لوله های ادراری (پیکان) و نفوذ سلولهای التهابی (نوک پیکان) دیده می شوند (H&E*40)



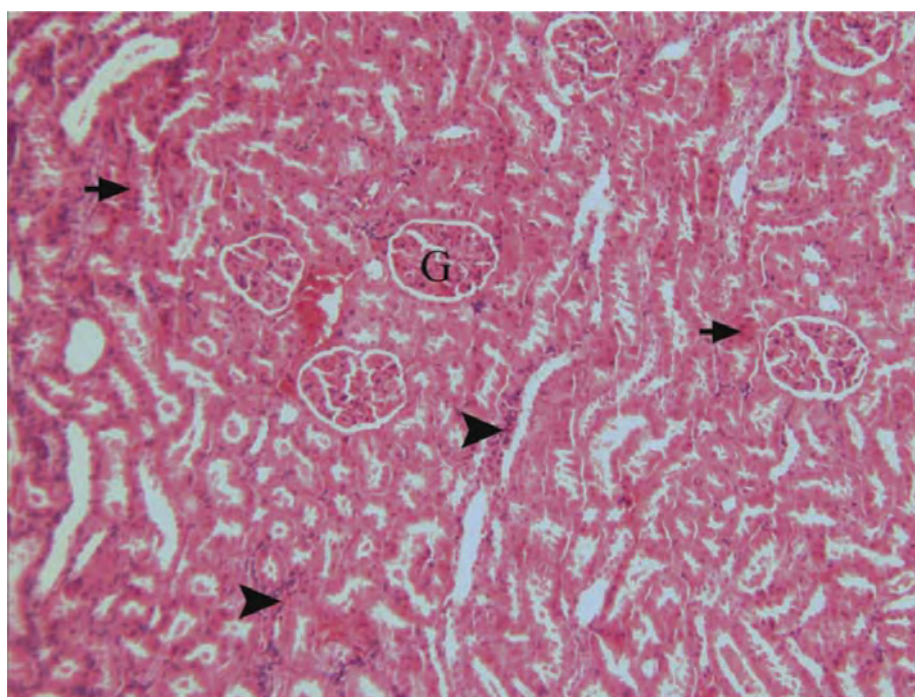
شکل ۷- کلیه در گروه چهارم، نفوذ سلولهای التهابی (نوک پیکان) دیده می شوند (H&E*10)



شکل ۸- کلیه در گروه چهارم، دژنراسیون لوله های ادراری (نوک پیکان) و نکروز لوله های ادراری (پیکان) دیده می شوند (H&E*40)



شکل ۹- کلیه در گروه پنجم، دژنراسیون (نوک پیکان) و نکروز لوله های ادراری (پیکان) تا حدودی دیده می شوند (H&E*40)



شکل ۱۰- کلیه در گروه پنجم، نفوذ کم سلولهای التهابی (نوک پیکان) و نکروز لوله های ادراری (پیکان) دیده می شوند (H&E*10)

ناشی از آن می-باشد (۲۰). رادیکال‌های آزاد اتم‌ها یا ملکول‌هایی با یک یا تعداد بیشتر الکترون جفت نشده هستند. رادیکال‌های آزاد عناصر اکسیدکننده‌ای هستند زیرا که آنها تمایل به گرفتن الکترون از اتم‌ها و مولکول‌های دیگر دارند تا به صورت جفت الکترون درآیند. رادیکال‌های آزاد به DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها از راه‌های مختلف صدمه می‌زنند که منجر به تخریب ژن‌ها، پروتئین‌های ساختمانی، آنزیم‌ها و سطح سلول‌ها می‌شوند. گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) که شامل رادیکال‌های آزاد سوپراکسید، یون هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن

کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز کاهش یافته را به مقدار طبیعی برگرداند. بطوری‌که سولفات منیزیم توانست آسیب‌های وارده به کلیه متعاقب القا ایسکمی- بازخونسانی را کاهش دهد. ایسکمی کلیوی حادثه مهمی است که معمولا می‌تواند متعاقب پیوند کلیه، همی نفرکتومی، شوک هموراژیک و بسیاری از بیماری‌های دیگر رخ دهد (۴). آسیب ایسکمیک- بازخونسانی کلیوی همچنین علت اصلی نارسایی حاد کلیه را تشکیل می‌دهد (۱۷). مرگ سلولی به دنبال آسیب ایسکمیک- بازخونسانی کلیوی در ارتباط نزدیک با تولید رادیکال‌های آزاد و لیپید پراکسیداسیون

جدول ۲- مقایسه آسیب‌شناسی بافتی کلیه بین گروه‌های مورد مطالعه در ۸ ساعت بعد از ایسکمی- بازخونسانی

پارامترهای مورد سنجش			گروه‌ها
التهاب	نکروز	تورم سلولی	
-	-	-	گروه شاهد
+++ a	+++a	+++a	گروه IR
++/-b	++/-b	++/-b	IR ± سولفات منیزیم ۲۵mg/kg
++/-b	++/-b	++/-b	IR ± سولفات منیزیم ۵۰ mg/kg
+/-c	+/-c	+/-c	IR ± سولفات منیزیم ۱۰۰ mg/kg

IR: ایسکمی- رپرفیوژن. a, b, c حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار است ($p < 0.05$).

جدول ۳- اثرات درمان با سطوح مختلف سولفات منیزیم بر مقایر بافتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در کلیه موش‌های صحرایی متعاقب ایسکمی- بازخونسانی

گروه‌ها	مالون‌دی‌الدئید (nmol/mg protein)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	گلوکاتایون پراکسیداز (U/mg protein)
گروه شاهد جراحی	۴/۸۹±۰/۳ c	-	-	۴۲/۱۵±۱/۷۴ a
گروه IR	۸/۳۳±۰/۷ a	+++ a	+++ a	۲۲/۶۵±۱/۹۶ c
IR ± سولفات منیزیم ۲۵mg/kg	۸/۱۱±۰/۴ a	++/- b	++/- b	۲۷/۳±۱/۲۷ c
IR ± سولفات منیزیم ۵۰ mg/kg	۷/۰۲±۰/۳ a	++/- b	++/- b	۳۳/۶۱±۱/۴ b
IR ± سولفات منیزیم ۱۰۰ mg/kg	۵/۳۲±۰/۲۷ b	+/- c	+/- c	۳۸/۹۸±۱/۵۲ b

RI: ایسکمی- بازخونسانی.

هندی و همچنین استرس اکسیداتیو القا شده به وسیله تشعشع در طناب نخاعی رت را کاهش دهد. تولید بیش از حد ROS موجب آسیب سلولی می‌شود. بنابراین مقادیر کم ROS برای فعالیت طبیعی سلولی نیاز است (۲). منیزیم دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و scavenging رادیکال‌های اکسیژن از طریق تاثیر بر Dismutation یون پروکسید است. منیزیم برای رشد سلولی ضروری است و کمبود آن تکثیر سلولی را با افزایش بیان فاکتورهای مهارکننده چرخه سلولی مانند p27 در سلول‌های اندوتلیال پستانداران و p21 در انسان مهار می‌کند. بنابراین کمبود منیزیم تولید رادیکال‌های آزاد و متعاقباً آسیب اکسیداتیو DNA را افزایش می‌دهد (۱۰). مکانیسم اینکه منیزیم چگونه فعالیت آنزیم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد مشخص نیست؛ اما احتمالاً منیزیم با متابولیسم کردن پروکسیدهای سلولی افزایش یافته، از فعالیت آنزیم‌ها محافظت می‌کند. همچنین موجب افزایش زمان فعالیت آنزیم‌ها می‌شود (۱۰). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز نشان داد که سولفات منیزیم در پیشگیری از عوارض ناشی از ایسکمی بازخونسازی که شامل نکروز و التهاب است، موثر می‌باشد و با سایر تحقیقات مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Gershon Holcberg و همکاران بر روی جفت انسان انجام شد، نتایج نشان داد که در صورتی که سولفات منیزیم و آنژیوتانسین ۲ به صورت جدا از هم حضور داشته باشند، ساختار جفت سطوح پایه‌ای و کم $TNF-\alpha$ و IL6 را ترشح می‌کند، اما با تزریق آنژیوتانسین ۲ در حضور سولفات منیزیم میزان $TNF-\alpha$ و IL6 بسیار بالاتر بوده است. در واقع تداخل اثر بین سولفات منیزیم و آنژیوتانسین ۲ منجر به افزایش قابل توجهی در تولید $TNF-\alpha$ و IL6 می‌شود و حتی سولفات منیزیم میزان این سایتوکاین‌ها را به دنبال تزریق آنژیوتانسین ۲ افزایش هم می‌دهد (۱۱). نتایج تحقیق حاضر با گزارش مذکور همخوانی دارد، هرچند در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت‌ها قادر به اندازه‌گیری مقادیر سیتوکین‌ها و $TNF-\alpha$ متعاقب تجویز سولفات منیزیم نبوده است؛ پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی اندازه‌گیری این فاکتورها انجام گیرد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، سولفات منیزیم می‌تواند جهت پیشگیری یا بهبود عوارض ناشی از ایسکمی-بازخونسازی مورد استفاده قرار گیرد. در هر صورت، شناخت دقیق ماده یا مواد موثر اصلی این ماده، تعیین دقیق مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن در این مورد و همچنین تاثیر انواع دوزهای متفاوت به مطالعات آتی نیاز دارد.

این طبقه از بافت پیوندی سست شامل سلول‌ها (چربی، فیبروبلاست، ماکروفاژ و ...) و همه رشته‌های بافت پیوندی، رگ‌های خونی، اعصاب و گانگلیون‌های عصبی (شکل C2) و مزوتلیوم تشکیل شده است (شکل A1). سلول‌ها و بافت چربی در این طبقه در سن ۳ روزگی مشاهده نشد ولی با افزایش سن، بتدریج بافت چربی ظاهر شده و میزان بافت چربی، رگ‌های خونی و رشته‌های کلاژن، الاستیک و رتیکیلر در این طبقه بسیار افزایش یافته بود (شکل‌های C2، و D2).

با مقایسه ساختار بافتی پیش معده در جنس نر و ماده، تغییرات بافتی قابل ملاحظه‌ای بین آن‌ها در سنین مختلف مشاهده نگردید. تنها تفاوت بافتی قابل توجه، بیشتر بودن سلول‌ها و بافت چربی در طبقه سروزی پیش معده جنس‌های ماده از سن ۲۸ روزگی به بعد (شکل D2)، نسبت به نرها بود (شکل C2).

و اکسیژن منفرد هستند، به‌نظر می‌رسد که رسانه‌های مهمی در آسیب ناشی از انسداد حالب باشند. از آنجایی که نقش غیرقابل انکاری برای ROS در پاتوفیزیولوژی بسیاری از انواع نارسایی حاد کلیوی ایسکمیک یا توکسیک گزارش شده است، بنابراین ممکن است در برخی تغییرات عملکردی و آسیب‌های مورفولوژیک مشاهده شده در کلیه طی انسداد حالب نیز دخیل باشند (۲۱). گونه‌های فعال اکسیژن، بسیار واکنش‌پذیر بوده و آسیب‌های جبران‌ناپذیری به ماکرومولکول‌های بدن جانداران از جمله ژنوم، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها وارد می‌سازند. در شرایط فیزیولوژیک یون سوپراکسید، در میتوکندری توسط آنزیم‌های زنجیره انتقال الکترون، در سیتوزول توسط آنزیم‌هایی نظیر گزانتین اکسیداز و NADPH اکسیداز، در شبکه آندوپلاسمی و توسط سیتوکروم P ۴۵۰ و در غشای پلاسمایی توسط آنزیم فسفولیپاز A2 طی متابولیسم اسیدهای آراشیدونیک تولید می‌گردد، که به سایر گونه‌های فعال اکسیژن هم می‌تواند تبدیل شود. میزان ROS در سلول‌ها و بافت‌ها در شرایط طبیعی، به علت تعادل بین تولید و حذف آنها توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، در یک حد معینی ثابت می‌ماند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مشتمل است بر آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز که ROS را پاک‌سازی می‌کنند (۱۶). به دلیل تعادل تقریبی بین تولید و میزان فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، به سادگی ممکن است که این تعادل به نفع تولید ROS به هم بریزد و همین موضوع باعث ایجاد آشفته‌گی در بیوشیمی سلول‌ها گردد. این عدم تعادل را استرس اکسیداتیو می‌نامند که منجر به آسیب‌های بافتی می‌شود (۱۳). در مطالعات قبلی خواص آنتی‌اکسیدانی سولفات منیزیم علیه یکسری از گونه‌های واکنشگر اکسیژن تایید شده است که می‌توان استنباط کرد، پیش‌درمانی با سولفات-منیزیم قبل از ایجاد ایسکمی-بازخونسازی سبب جلوگیری از ایجاد آسیب رادیکال‌های آزاد بر بافت می‌گردد. از جمله در مطالعه‌ای که دیابت تجربی به وسیله‌ی الوکسان ایجاد شده بود و همراه با افزایش استرس اکسیداتیو بوده است، تامین منیزیم توانسته تا حدی پارامترهای آنتی‌اکسیدانی را احیا کند و استرس اکسیداتیو را کاهش دهد (۱۰). منیزیم میزان تولید آنزیم‌های خنثی‌کننده رادیکال‌های آزاد و سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهد (۱) درحالی‌که کاهش منیزیم حساسیت سلولی به تخریب اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (۹) و موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در مطالعات سلولی می‌شود (۸). همچنین مشخص شده است که سولفات منیزیم اثرات حفاظتی بر نورون‌ها متعاقب کانونی و گلوبال مغزی، آسیب تروماتیک مغز، آسیب حاد طناب نخاعی و خونریزی لایه آراکینوئید دارد. احتمال داده شده است سولفات منیزیم این عمل را به وسیله یکی از مکانیسم‌های زیر شامل جلوگیری از سمیت گلوتامات از طریق بلاک کردن گیرنده‌های N-methyl-D aspartate، جلوگیری از ترومبوز رگ‌ها در مناطق آسیب دیده با مهار فعال شدن پلاکت‌ها و مهار استفاده از گلوکاتایون منیزیم و مهار لیپید پروکسیداسیون اثرات خود را اعمال می‌کند. همچنین منیزیم غلظت ATP را بعد از ایسکمی بازخونسازی تنظیم می‌کند (۳۱). منیزیم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد و در بیماران پره‌کلامپتیک درمان شده با سولفات منیزیم، لیپید پروکسیداسیون کمتری نسبت به گروه درمان نشده داشتند. در تایید این مطلب مطالعات پیشین نشان داده که سولفات منیزیم می‌تواند آسیب مغزی ایجاد شده در اثر هایپوکسی در نوزاد کوچک

lism in obstructive nephropathy. *Semin Nephrol.* 231-39.

14. Liaño, F., Junco, E., Pascual, J., Madero, R. and E. Verde.

1998. The spectrum of acute renal failure in the intensive care unit compared with that seen in other settings. The Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney international. Supplement.* 66S16-24.

15. Liu, D. L., Jeppsson, B., Hakansson, C. H. and R. Odselius. 1996. Multiple-system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption: Electron microscopic findings. *Archives of Surgery.* 131(4): 442.

16. Modi, K. S., Schreiner, G. F., Purkerson, M. L. and S. Klahr. 1992. Effects of probucol in renal function and structure in rats with subtotal kidney ablation. *J Lab Clin Med.* 120310-317.

17. Montagna, G., Hofer, C. G. and A. M. Torres. 1998. Impairment of cellular redox status and membrane protein activities in kidneys from rats with ischemic acute renal failure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease.* 1407(2): 99-108.

18. Nishikimi, M., Rao, N. A. and K. Yagi. 1972. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochemical and biophysical research communications.* 46(2): 849-854.

19. Oldenburg, O., Qin, Q., Krieg, T., Yang, X.-M., Philipp, S., Critz, S. D., Cohen, M. V. and J. M. Downey. 2004. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.* 286(1): H468-H476.

20. Paller, M. S., Hoidal, J. and T. F. Ferris. 1984. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *Journal of Clinical Investigation.* 74(4): 1156.

21. Palm, F., Cederberg, J., Hansell, P., Liss, P. and P. O. Carlsson. 2003. Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. *Diabetologia.* 46(8): 1153-1160.

22. Perdrizet, G. A., Giles, D. L., Dring, R., Agarwal Jr, S. K., Khwaja, K., Gao, Y. Z., Geary, M., Cowell, V. L., Berman, M. and R. Brautigam. 2006. Major hepatic trauma: warm ischemic tolerance of the liver after hemorrhagic shock. *Journal of Surgical Research.* 136(1): 70-77.

23. Rotruck, J., Pope, A., Ganther, H., Swanson, A., Hafeman, D. G. and W. Hoekstra. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179(4073): 588-590.

24. Seth, P., Kumari, R., Madhavan, S., Singh, A. K., Mani, H., Banaudha, K. K., Sharma, S. C., Kulshreshtha, D. K. and R. K. Maheshwari. 2000. Prevention of renal ischemia-reperfusion-induced injury in rats by picroliv. *Biochemical pharmacology.*

منابع مورد استفاده

1. Afanas' ev, I. B., Suslova, T. B., Cheremisina, Z. P., Abramova, N. E. and L. G. Korkina. 1995. Study of antioxidant properties of metal aspartates. *Analyst.* 120 (3): 859-862.

2. Agarwal, A., Sharma, R. K., Desai, N. R., Prabakaran, S., Tavares, A. and E. Sabanegh. 2009. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology.* 73(3): 461-469.

3. Beyer, W. F. and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry.* 161(2): 559-566.

4. Defraigne, J. O., Pincemail, J., Detry, O., Franssen, C., Meurisse, M. and R. Limet. 1995. Variations of glutathione and vitamin E concentrations after hypothermic storage in Euro-Collins solution and reperfusion of the rabbit kidney. *Transplantation Proceedings.* 27(5): 2783-2785.

5. Eckert, P. and K. Schnackerz. 1991. Ischemic tolerance of human skeletal muscle. *Annals of Plastic Surgery.* 26(1): 77-84.

6. Elin, R. (1987): Assessment of magnesium status. *Clinical Chemistry.* 33(11):1965-1970.

7. Fellstrom, B., Akuyrek, L. M. and L. Zezina. 1998. Post ischemic reperfusion injury and allograft arteriosclerosis. *Transplant Proc.* 384278-4280.

8. Freedman, A. M., Atrakchi, A. H., Cassidy, M. M. and W. B. Weglicki. 1990. Magnesium deficiency-induced cardiomyopathy: protection by vitamin E. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 170(3): 1102-1106.

9. Freedman, A. M., Mak, I. T., Stafford, R. E., Dickens, B. F., Cassidy, M. M., Muesing, R. A. and W. B. Weglicki. 1992. Erythrocytes from magnesium-deficient hamsters display an enhanced susceptibility to oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 262(6): C1371-C1375.

10. Hans, C. P., Chaudhary, D. P. and D. D. Bansal. 2003. Effect of magnesium supplementation on oxidative stress in alloxanic diabetic rats. *Magnesium research.* 16(1): 13-19.

11. Holcberg, G., Amash, A., Sapir, O., Hallak, M., Sheiner, E., Ducler, D., Katz, M. and M. Huleihel. 2006. Different effects of magnesium sulfate and angiotensin II on the capacity of the fetal and maternal compartments of normal human placenta to secrete TNF- α and IL-6. *Journal of reproductive immunology.* 69(2): 115-125.

12. Jaeschke, H. and A. Farhood. 2002. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free Radical Biology and Medicine.* 33(2): 210-219.

13. Kurokawa, K., Fine, L. G. and S. Klahr. 1982. Renal metabo-

59(10): 1315-1322.

25. Sheridan, A. M. and J. V. Bonventre. 2001. Pathophysiology of ischemic acute renal failure. 1327-21.

26. Taheri, Y. A., Neshat, M., Garjani, A. and N.Y. Doustar. 2012. Study the effects of metformin on renal function and structure after unilateral ischemia-reperfusion in rat. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 7(5): S77.

27. Tountas, C. and R. Bergman. 1977. Tourniquet ischemia: ultrastructural and histochemical observations of ischemic human muscle and of monkey muscle and nerve. *The Journal of hand surgery*. 2(1): 31.

28. Unal, D., Yeni, E., Erel, O., Bitiren, M. and H. Vural. 2002. Antioxidative effects of exogenous nitric oxide versus antioxidant vitamins on renal ischemia reperfusion injury. *Urological Research*.

30(3): 190-194.

29. Vesey, D. A., Cheung, C., Pat, B., Endre, Z., Gobé, G. and D. W. Johnson. 2004. Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 19(2): 348-355.

30. Yamakawa, Y., Takano, M., Patel, M., Tien, N., Takada, T. and G. B. Bulkley. 2000. Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation. *Annals of Surgery*. 231(3): 387.

31. Yavuz, Y., Mollaoglu, H., Yürümez, Y., Uçok, K., Duran, L., Tünay, K. and L. Akgün. 2013. Therapeutic effect of magnesium sulphate on carbon monoxide toxicity-mediated brain lipid peroxidation. *European review for medical and pharmacological sciences*. 1728-33.

