مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۱، شماره ۲ ، صفحات ۱۵۳ تا ۱۶۳ ، (۱۳۸۲)

اثر آماده‌سازی بافتی بر تغییرات مقدار ویتامین E در شرایط ایسکمی- پرفیوژن مجدد در کلیه موش صحرایی

دکتر سیمین آریامنش (دکترای فیزیولوژی)، دکتر مهدیهٔ فقیهی (استادیار)، دکتر مهری کدخدایی (دانشیار)
دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی

چکیده

مقدمه: پرفیوژن مجدد (رسیدن دوبارهٔ خون به بافت) آسیب اولیهٔ حاصل از حمله ایسکمی را به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد شدیدتر می‌کند. برای کاهش صدمات ناشی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد لازم است راه‌کارهایی در نظر گرفته شود که یکی از آنها آماده‌سازی بافتی می‌باشد. بنابراین مدلی که بتوان از دوره‌های کوتاه‌مدت متناوب بستن و باز کردن سرخرگ کلیوی (آماده‌سازی ایسکمیک Ischemic Pre-Conditioning=IPC) جهت حفاظت عضو از اثرات متعاقب ایسکمی طولانی و پرفیوژن مجدد بر روی کلیهٔ موش صحرایی استفاده کرد، طراحی و برقرار شد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، ۲۸ موش صحرایی نر به طور تصادفی و مساوی در ٤ گروه تقسیم شدند:
گروه کنترل (Sham- operated)، گروه ایسکمی- پرفیوژن مجدد (Ischemia- reperfusion (IR)، گروه آماده‌سازی بافتی ایسکمیک (IPC) و گروه ایسکمی- پرفیوژن مجدد متعاقب آماده‌سازی ایسکمیک (IPC- IR). آماده‌سازی ایسکمیک (IPC) شامل بستن متناوب سرخرگ کلیه برای ۵ دقیقه و باز کردن آن برای ۵ دقیقه،برای سه دوره می‌باشد. مؤثر بودن IPC با تعیین میزان تغییرات ویتامین E بافت و پلاسمای خون ورید کلیه به عنوان آنتی‌اکسیدان اندروژن پس از استخراج که به وسیلهٔ دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که مقدار ویتامین E بافت و پلاسمای ورید کلیه در گروه IR نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد ($p< ۰/۰۰۰۱$). در حالیکه مقدار این ویتامین در هر دو بافت و پلاسمای ورید کلیوی به طور معنی‌داری در گروه IPC-IR بالاتر از گروه IR بوده است ($p< ۰/۰۰۰۱$)، ولیکن نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

نتیجه گیری و توصیه ها: در این مطالعه، روش آماده‌سازی بافتی مانع از کاهش مقدار آنتی‌اکسیدان اندوژن (ویتامین E) در اثر ایسکمی بلندمدت متعاقب گردید. پیشنهاد می‌شود که آماده‌سازی بافتی می‌تواند از جهاتی کلیه را از ضایعات ناشی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد حفظ کند.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

مقدمه

در جریان پیوند کلیه و سایر اعضاء، عضو مورد پیوند باید مدت زمانی بدون خونرسانی یا با جریان کم خون خارج از بدن باقی بماند. این موضوع موجب رهایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (OFR) می‌شود. بدین منظور در سالهای اخیر مطالعات بسیاری بر روی اثرات مخرب خونرسانی مجدد Reperfusion (R) متعاقب قطع خون Ischemia (I) در اندام‌های مختلف از جمله کلیه صورت گرفته است (١،٢).

در این ارتباط رادیکال‌های آزاد اکسیژن (OFR) به عنوان عوامل احتمالی ایجاد کنندهٔ ضایعات بافتی و اختلال عمل ارگانها مطرح گردیده‌اند (٣،٤).

گزارشات متعددی از مفید بودن داروهای آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از ضایعات ارائه شده است (٥) و از سوی دیگر مفید بودن کاربرد روشهایی از قبیل آماده‌سازی ایسکمیک (IPC) در شرایط invivo (در بدن) در سالهای اخیر در جلوگیری از ضایعات در اندام‌های دیگر مطرح گردیده است (٦،٧). همچنین گزارشات محدود و متناقصی در مورد اثر IPC بر روی کلیه وجود دارد (٨؛٩).

با توجه به نقش دوگانهٔ IPC که در مطالعات پیشین مطرح شده است پژوهشگران سعی نموده‌اند با به کار بردن روشهای مختلفی از IPC، جوانب متفاوت اثرات آن را در کلیه مورد بررسی قرار دهند. لذا در این مطالعه برای روشن نمودن وضعیت استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) در کلیهٔ موش صحرایی و مقابله با آن، از دوره‌های کوتاه‌مدت ایسکمی و پرفیوژن مجدد بدون استفاده از هرگونه دارو (IPC) و با اندازه‌گیری معیاری متفاوت از گزارشات قبلی در مورد کلیه، یعنی اندازه‌گیری میزان ویتامین E استفاده گردید.

گزارشاتی مبنی بر کاهش ویتامین E طی ایسکمی- پرفیوژن مجدد در ارگان‌های مختلف از جمله کلیه وجود دارد ولی در مورد اثر IPC بر میزان ویتامین E در کلیه و اثر IPC در جلوگیری از کاهش این ویتامین بدنبال ایسکمی- پرفیوژن مجدد مقاله‌ای وجود ندارد. به همین دلیل در مطالعه حاضر اثر IPC بر میزان ویتامین E در کلیه در طی ایسکمی- پرفیوژن مجدد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه می‌تواند جهت بالا بردن درصد موفقیت پیوند عضو مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

در این بررسی از ٤ گروه کنترل (شاهد) جراحی[1]، گروه ایسکمی- پرفیوژن مجدد[2] (IR)، گروه آماده سازی ایسکمیک[3] (IPC) و گروه ایسکمی- پرفیوژن مجدد متعاقب (IPC- IR) IPC استفاده شد.

هر گروه شامل ٧ موش صحرایی نر سفید با وزن ٣٠٠-٢٢٠ گرم بودند که در شرایط دسترسی آزاد به آب و غذا و ١٢ ساعت روشنایی، ١٢ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. مادهٔ بیهوشی به کار رفته شامل کتامین هیدروکلرید (٥٠ mg/kg) و کلرپرومازین هیدروکلرید (٢٥ mg/kg) با تزریق داخل صفاقی بود.

١- گروه کنترل: در این گروه حیوان فقط تحت عمل جراحی قرار می‌گرفت. به این ترتیب که برش طولی و عرضی روی شکم بدون آسیب رسیدن به اندام‌های داخلی، داده می‌شد. محل زخم با تنظیف آغشته به محلول نمکی ٩ درصد مرطوب نگهداشته می‌شد و در زیر نور چراغ برای حفظ حرارت بدن در دمای اتاق قرار داده می‌شد. پس از ٧٠ دقیقه (جهت تطابق زمانی با گروه‌های دیگر)، ابتدا خون ورید کلیهٔ راست به کمک سرنگ ٢ ml آغشته به EDTA کشیده و به درون لولهٔ شیشه‌ای ١٠ ml منتقل می‌شد. لوله‌های حاوی خون مدت ٢٠ دقیقه با ٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شدند. سپس پلاسما تا موقع استفاده در فریزر ٢٠- °C و به دور از نور نگهداری می‌شد. کلیه‌های راست هم بلافاصله پس از خونگیری از بدن جدا گشته و پس از جدا کردن کپسول و چربی از آنها، در PBS سرد شسته می‌شدند. کلیه‌ها پس از قرار داده شدن در آلومینیوم فویل در فریزر ٢٠- °C تا انجام آزمایش نگهداری می‌شدند.

[1] Sham- operated control group
[2] Ischemia- reperfusion
[3] Ischemic- preconditioning

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

۲- گروه IR: این گروه نیز مورد عمل جراحی قرار می‌گرفتند. ابتدا شکم ۳۰ دقیقه بازمانده، بعد به وسیله گیره (کلامپ) سرخرگ کلیهٔ راست به مدت ۳۰ دقیقه بسته شده (ایسکمی بلند مدت) و پس از ۱۰ دقیقه پرفیوژن، خون سیاهرگ کلیه راست به وسیله سرنگ حاوی EDTA برداشت می‌شد و کلیه راست هم به وسیله عمل جراحی از محل ناف کلیه جدا می‌گردید و مثل گروه کنترل روی آنها عمل می‌شد.

تذکر: در تمام طول ایسکمی کلیه ایسکمی شده به رنگ تیرهٔ متمایل به سیاه درمی‌آمد و کاملاً از کلیه ایسکمی نشده که به رنگ قهوه‌ای است، متفاوت می‌بود.

۳- گروه آماده‌سازی ایسکمیک (IPC): در این گروه نیز حیوان را جراحی کرده ابتدا شکم ٤۰ دقیقه باز مانده، بعد به وسیله گیره سه نوبت ۵ دقیقه‌ای ایسکمی و سه نوبت ۵ دقیقه‌ای پرفیوژن مجدد به طور متناوب به حیوان داده می‌شد. پس از زمان ۷۰ دقیقه‌ای، خون ورید کلیهٔ راست با سرنگ حاوی EDTA گرفته و کلیهٔ راست با عمل جراحی خارج می‌شد و مثل گروه کنترل روی آنها عمل می‌گردید.

٤- گروه ایسکمی- پرفیوژن مجدد متعاقب آماده‌سازی (IPC-IR): ابتدا پس از باز کردن شکم، بلافاصله سه نوبت ۵ دقیقه‌ای ایسکمی و سه نوبت ۵ دقیقه‌ای پرفیوژن مجدد به طور متناوب به حیوان داده می‌شد. پس از آن، یک دورهٔ ۳۰ دقیقه‌ای ایسکمی و یک دوره ۱۰ دقیقه‌ای پرفیوژن مجدد به حیوان داده می‌شد. در انتهای ۷۰ دقیقه خون ورید کلیه راست گرفته می‌شد و کلیه راست نیز خارج می‌گردید تا مثل گروه کنترل روی آنها عمل شود.

استخراج ویتامین E از پلاسما

استخراج ویتامین E از پلاسما با استفاده از روش آرنود ۱۹۹۱ انجام شد (۱۰). کلیه مراحل استخراج در زیر نور کم و منتشر انجام می‌شد. همچنین برای جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها از BHT استفاده می‌گردید (۱۱).

استخراج ویتامین E از بافت کلیه

روش استخراج ویتامین E از بافت کلیه، روش تغییر یافته پنگ (۱۹۹۲ و ۱۹۹۳) می‌باشد (۱۲،۱۳). مزیت این روش به روش صابونی شدن در استخراج ویتامین E، استخراج مقدار بیشتری از میکرونوترینت‌ها از مقدار کم بافت می‌باشد.

ویتامین E و ویتامین E استات استاندارد از شرکت مرک- آلمان تهیه گردید. ویتامین E استاندارد جهت رسم منحنی استاندارد و تعیین زمان بازدارندگی (Retention time) مورد استفاده قرار گرفت.

روش تهیه فاز متحرک برای دستگاه HPLC

۸۵ ml از متانول را با ۱۰ ml از استونیتریل برای جداسازی بهتر منحنی‌ها (١٤) و ۵ ml از هگزان مخلوط کرده به وسیله فیلتر آبی- آلی ۰/۲۲ µm توسط پمپ خلاء فیلتر می‌گردید. سرعت خروج فاز متحرک از دستگاه ۱ ml/min و حجم محلول تزریق شده به دستگاه ۵۰ µl، حساسیت دتکتور ۰/۰۱ با فیلتر ۱ و سرعت حرکت کاغذ ۰/۵ سانتی‌متر در دقیقه بود. تزریقات به وسیله سرنگ هامیلتون ۱۰۰ µl و اترزمیلی‌پور انجام می‌شد.

روش آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها

در هر گروه از مقادیر بدست آمده متغیرهای وابسته، میانگین گرفته می‌شد و انحراف معیار آن به دست می‌آمد چون بیش از دو گروه و در هر مقایسه یک متغیر وجود داشت با استفاده از نرم‌افزار SAS تست آنالیز واریانس یک طرفه One-way Analysis of variance (ANOVA) انجام شد و جهت معنی‌دار بودن اختلافات بین گروه‌ها تست مقایسه چندگانه استیودنت نیومن- کولز به کار برده می‌شد. برای رسم نمودار از نرم‌افزار excell استفاده گردید.

یافته ها

در این مطالعه میزان ویتامین E در خون وریدی و بافتی کلیه راست در چهار گروه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج زیر بدست آمد.

شکل ۱- نشان‌دهنده کروماتوگرامهای ویتامین E استخراج شده از پلاسما در گروه‌های چهارگانه است. زمان بازدارندگی ویتامین E در همه گروه‌ها یکسان است. ارتفاع و سطح زیر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

منحنی‌ها (معادل ویتامین E در نمونه) در گروه IR کمتر از گروه کنترل ولی در گروه IPC- IR معادل گروه کنترل و بیشتر از گروه IR می‌باشد. همین مطلب نیز در مورد کروماتوگرام ویتامین E در بافت کلیه صدق می‌کند (شکل ٢). میانگین‌های مقادیر ویتامین E پلاسما در جدول شماره ١ و بافت در جدول ٢ آمده است.

جدول شماره ١- میانگین‌های مقادیر ویتامین E پلاسمای ورید کلیه راست موش صحرایی در گروه‌های چهارگانه

گروه‌ها	مقادیر ویتامین E (mean±SEM)*
کنترل پلاسما	٣/٣٤٠±٠/١٩٥
IR پلاسما	٢/٣٥٦±٠/٠٦٢
IPC پلاسما	٥/٠٧٦±٠/٣٧١
IPC-IR پلاسما	٣/٧١١±٠/٢٦٤

* مقدار ویتامین E بر حسب میکرومول در لیتر µm/l و به صورت (انحراف معیار±میانگین) آمده است.

جدول شماره ٢- میانگین‌های مقادیر ویتامین E بافت کلیه راست موش صحرایی در گروه‌های چهارگانه

گروه‌ها	مقادیر ویتامین E (mean±SEM)*
کنترل بافت	٣/٤٩٢±٠/٢٨٠
IR بافت	٢/٩١٣±٠/١٥٧
IPC بافت	٣/٢٣١±٠/١٣١
IPC-IR بافت	٣/٣٨١±٠/٢٣١

* مقدار ویتامین E بر حسب میکرومول در لیتر (µm/L) و به صورت (انحراف معیار± میانگین) آمده است.

همچنین با انجام تست‌های آنالیز واریانس یک طرفه و استیودنت نیومن- کولز جهت بررسی آماری میزان اختلافات، نتایج زیر حاصل گردید.

الف) میزان ویتامین E استخراج شده از پلاسمای خون ورید کلیه راست

میزان ویتامین E استخراج شده از پلاسمای خون ورید کلیه راست در گروه IR کاهش معنی‌داری نسبت به سه گروه دیگر (کنترل، IPC و IPC-IR) نشان می‌دهد (p< ٠/٠٠٠١). همچنین میزان ویتامین E پلاسمای گروه IPC نسبت به سه گروه دیگر نیز افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (p<٠/٠٠٠١) (نمودار ١).

میزان ویتامین E در گروه IPC-IR نسبت به گروه IR افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد (p<٠/٠٠٠١) ولی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

ب) میزان ویتامین E استخراج شده از بافت کلیه راست

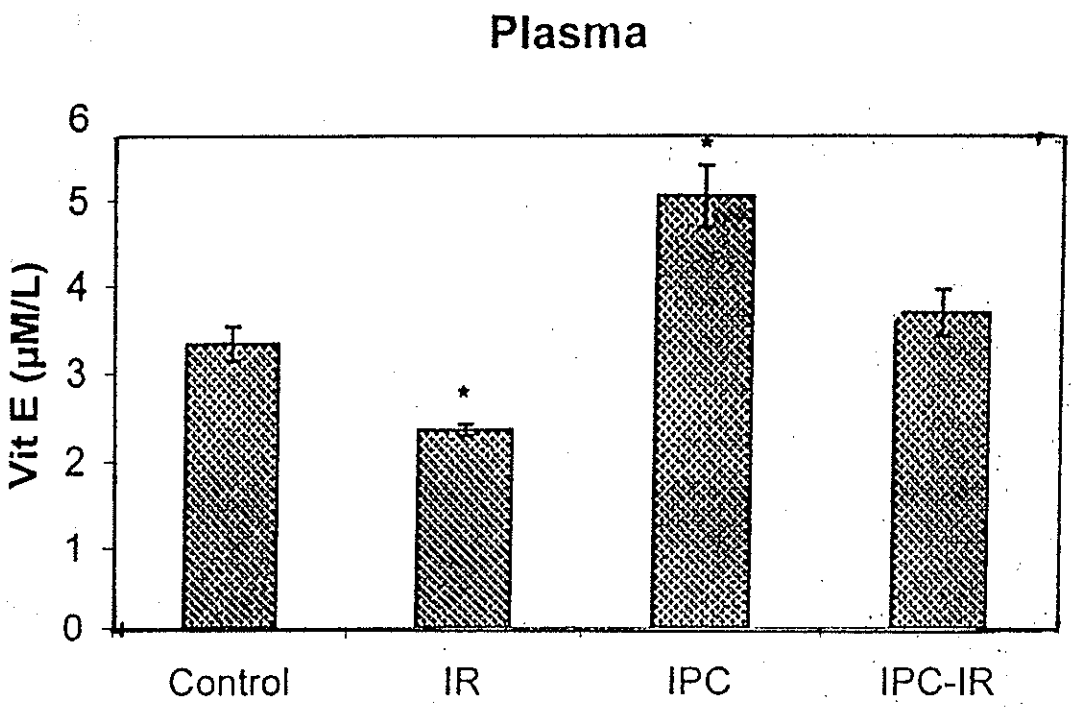
میزان ویتامین E استخراج شده از بافت کلیه راست در گروه IR کاهش معنی‌داری (p< ٠/٠٠٠١-) نسبت به سه گروه دیگر (کنترل، IPC و IPC- IR) نشان می‌دهد، اما میزان ویتامین E گروه‌های IPC-IR و IPC نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهددر حالی‌که نسبت به گروه IR افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد (p <٠/٠٠٠١.) (نمودار ٢).

بحث

مهمترین عامل نارسایی حاد کلیوی ایسکمی است که منجر به ضایعه عملکردی کلیه می‌شود. ایسکمی کلیوی ناشی از انقباض عروق کلیوی، انسداد توبول کلیوی، حرکت معکوس مایع فیلترهٔ گلومرولی، کاهش قابلیت نفوذ گلومرولی و کاهش سرعت فیلتراسیون گلومرولی می‌باشد (١٥). کاهش منابع فسفاتهای پرانرژی، افزایش غلظت کلسیم آزاد داخل سلولی، از بین رفتن عمل سنتز سلولی، فعال شدن روندهای تجزیه و تخریب غشاء و تولید سموم غشایی اندوژن از دیگر عوامل مؤثر آسیب سلولی در طی ایسکمی می‌باشند. درک طبیعت و راه‌های مختلفی که در القاء ایسکمی موجب آسیب بافتی و سلولی می‌شود می‌تواند راه‌کارهای جدیدی برای معالجه و پیشگیری از وقوع صدمه در پیش روی ما بگذارد (١٥).

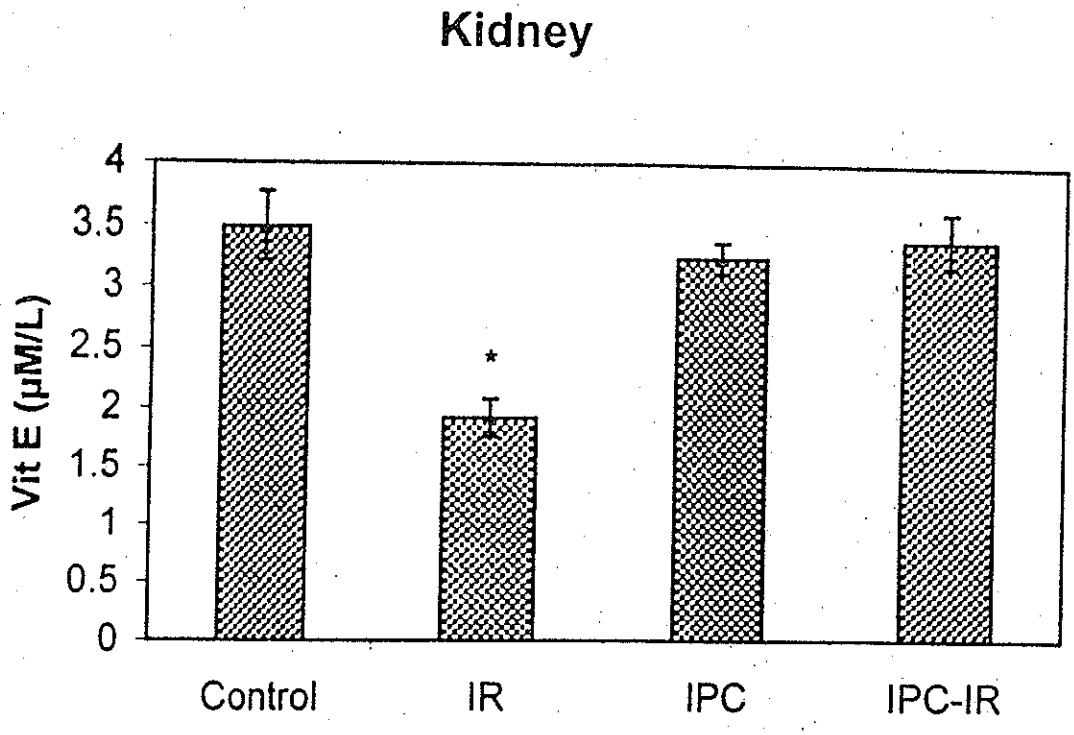
ایسکمی کلیوی منجر به کاهش سریع ATP بافتی و افزایش مواد حاصل از تجزیهٔ ATP (آدنوزین، اینوزین و هیپوگزانتین) می‌شود (١٦)، تجمع هیپوگزانتین در طی ایسکمی موجب تشکیل رادیکالهای آزاد بسیار فعال می‌گردد، زیرا تبدیل آنزیمی هیپوگزانتین به گزانتین به وسیلهٔ گزانتین اکسیداز موجب تولید رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\bullet-}$) در اثر احیاء مولکول اکسیژن می‌شود (١٧). رادیکال سوپراکسید و محصولات حاصل از عمل احیاء آن (پراکسید هیدروژن H_2O_2 و رادیکال هیدروکسیل $OH^{\bullet}$) می‌توانند از طریق پراکسیداسیون چربی غشاءهای

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]



IR= Ischemia- Reperfusion
IPC= Ischaemic Pre- Conditioning

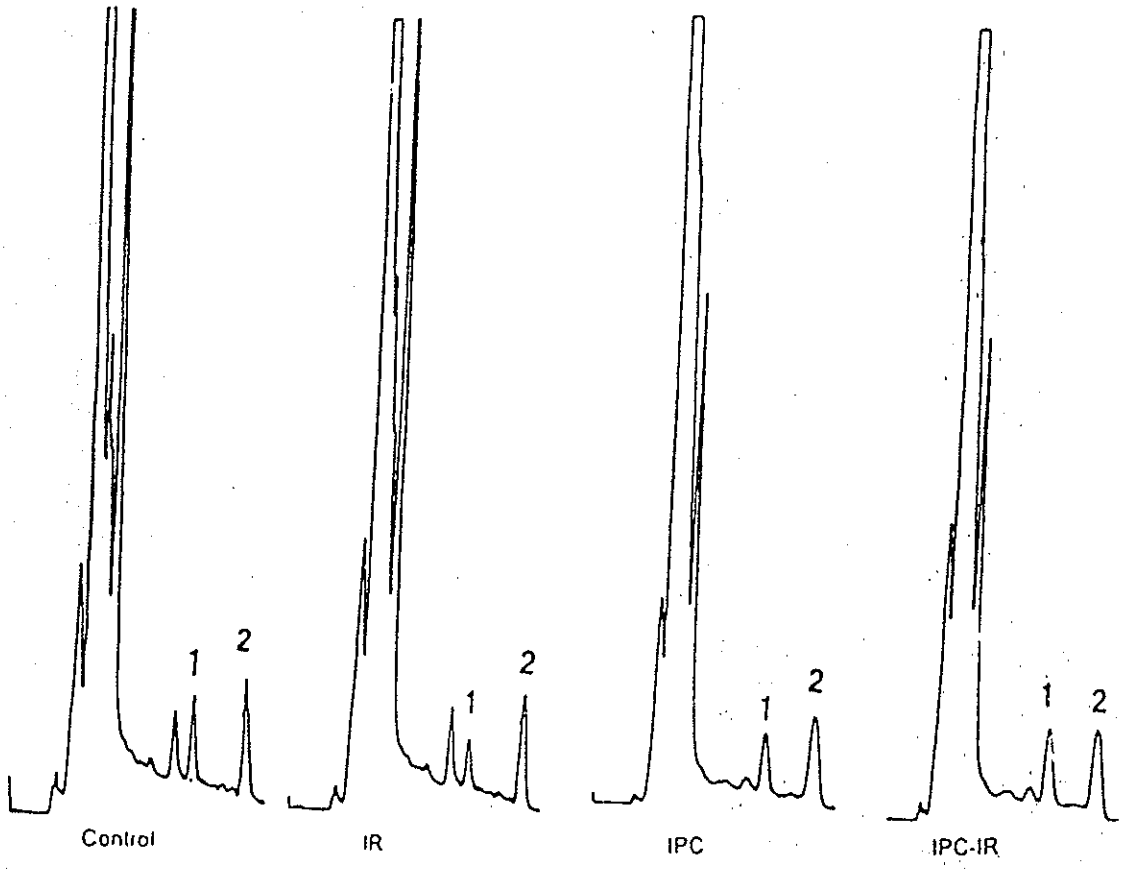
نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین‌های مقادیر ویتامین E پلاسمای ورید کلیه راست موش صحرایی در گروه‌های IPC-IR, IPC, IR و مقایسه آن با گروه کنترل ($p< ۰/۰۰۰۱$)



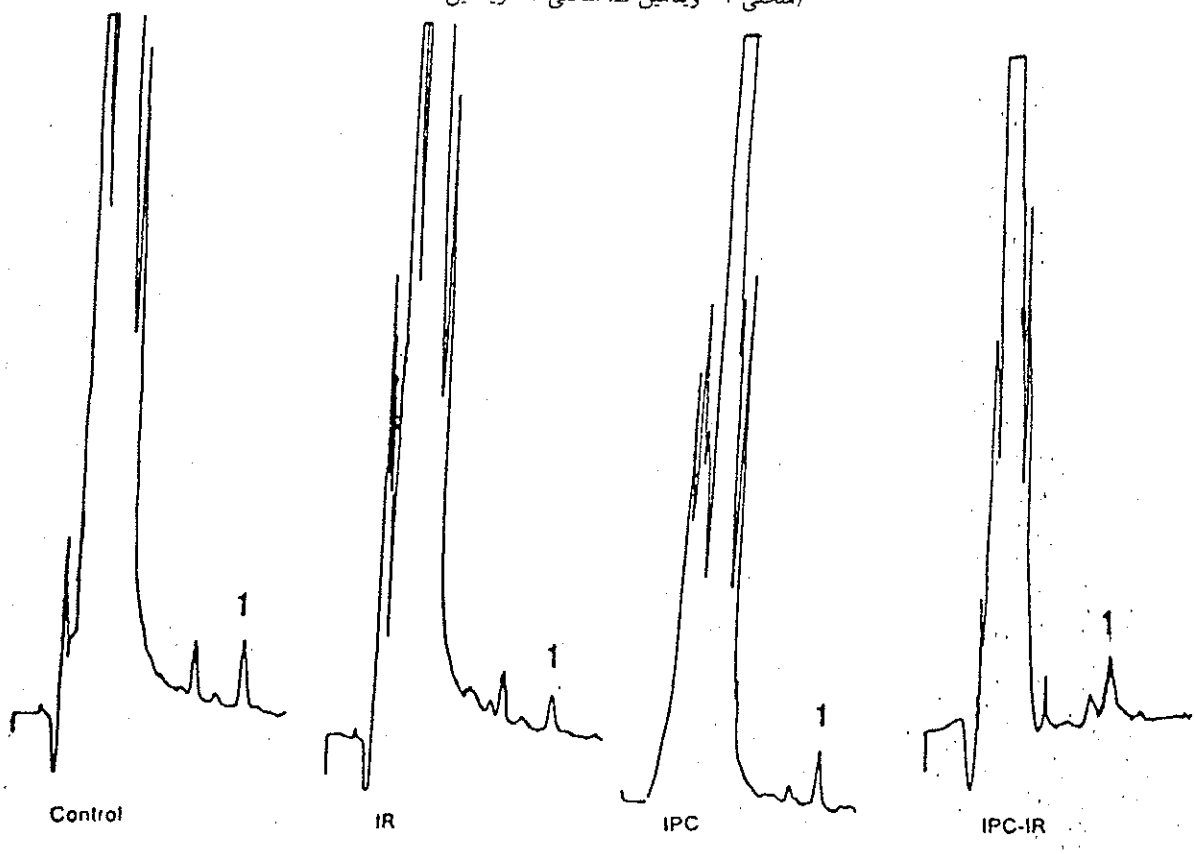
IR= Ischemia- Reperfusion
IPC= Ischaemic Pre- Conditioning

نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین‌های مقادیر ویتامین E بافت کلیه راست موش صحرایی در گروه‌های IPC-IR, IPC, IR و مقایسه آن با گروه کنترل ($p< ۰/۰۰۰۱$)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]



شکل ١- کروماتوگرام‌های مربوط به استخراج ویتامین E از پلاسمای خون ورید کلیه راست موش صحرایی در گروه‌های چهارگانه
(منحنی ١- ویتامین E، منحنی ٢- ویتامین E استات)



شکل ٢- کروماتوگرام‌های مربوط به استخراج ویتامین E از بافت کلیه راست موش صحرایی در گروه های چهارگانه (منحنی ١- ویتامین E)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

میتوکندری، لیزوزومی و پلاسمایی، آسیب عملکردی و ساختمانی ایجاد کنند (۱۸).

به طور طبیعی، بافتها حاوی مقادیر کافی از اکسیدانهای اندوژن برای حفاظت خود علیه آسیب رادیکال آزاد اکسیژن هستند. سوپراکسید دسموتاز (SOD) به سرعت $O_2^{\cdot-}$ را از محیط دور می‌کند، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را غیر فعال می‌کنند و تریپتوفان، هیستیدین، ویتامین C و ویتامین E، رادیکال هیدروکسیل را پاک می‌کنند (۱۹).

با وجود این در طی ایسکمی ذخائر آنتی‌اکسیدانهای اندوژن در مبارزه با رادیکالهای آزاد Free radicals (FR) به تدریج کاهش یافته و منجر به آسیب سلولی حاصل از حملهٔ رادیکالهای آزاد اکسیژن بخصوص در موقع پرفیوژن مجدد و اکسیژن‌رسانی می‌شود. دلیل بر این مدعا، کاهش تدریجی آکسیدانها در بافتها می‌باشد، چنانچه در مغز (۲۰) و قلب (۲۱) گزارشهایی در این زمینه ارائه شده است. به این ترتیب که تحت شرایط ایسکمی پرفیوژن مجدد (IR) ابتدا اکسیدانهای محلول در آب آسکوربات، گلوتاتیون و SOD در مبارزه با اکسیدانها اکسیده می‌شوند و سپس آنتی‌اکسیدانهای محلولی در چربی (یوبی‌کوئینول ۹ و ویتامین E) وارد عمل می‌شوند. این موضوع نشان می‌دهد که قبل از مصرف ویتامین E، آنتی‌اکسیدانهای دیگر مصرف شده سپس ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان نهایی برای حفظ تمامیت غشاءهای سلولی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد. بدین جهت اندازه‌گیری ویتامین E، علاوه بر اندکس قابل قبول پراکسیداسیون چربی در انسان، می‌تواند به عنوان آخرین سد دفاعی در مقابله با IR با اهمیت باشد (۲۱). در طی پیوند کلیه و سایر اعضاء، عضو مورد پیوند ناگزیر باید مدتی خارج از بدن با مقدار خیلی کم خون یا بدون خونرسانی باقی بماند (ایسکمی). این موضوع موجب رهایش رادیکالهای آزاد اکسیژن (OFR) می‌شود. پرفیوژن مجدد (رسیدن دوبارهٔ خون به بافت) آسیب اولیه حاصل از ایسکمی را در پاسخ به محصول رادیکالهای آزاد شدیدتر می‌کند. مطالعات متعددی در مورد اثرات مخرب خونرسانی مجدد به دنبال ایسکمی در اندامهای مختلف از جمله کلیه صورت گرفته است (۴،۲۲). در این ارتباط رادیکالهای آزاد به عنوان عامل تشدید کنندهٔ ضایعات بافتی و اختلال عمل ارگانها مطرح گردیده‌اند (۴).

آسیب اکسیدانی می‌تواند به سه علت پیش آید:

۱) تولید اضافی رادیکالهای آزاد اکسیژن

۲) کاهش آنتی‌اکسیدانها

۳) مجموعاً چون آنتی‌اکسیدانها باعث خارج کردن متابولیتهای اکسیژن سمی می‌شوند، در کم کردن آسیب حاصل از IR نقش مؤثری دارند (۲۳).

از مدتها قبل ویتامین E به عنوان آنتی‌اکسیدان محلول در چربی که باعث پایدار کردن چربی‌های غیر اشباع بر علیه اکسیداسیون خودبخودی می‌شود، شناخته شده بود. توافق همه جانبه‌ای در این مورد که ویتامین E دارای عمل حفاظتی مشابهی در بافتها می‌باشد، وجود دارد. ویتامین E باعث نابودی رادیکال‌های آزاد در محیط هیدروفوب می‌شود (۲۴).

رادیکال‌های آزاد به وسیلهٔ روندهای طبیعی متابولیسمی یا از فاکتورهای خارجی و عواملی مثل تشعشعات، مواد سمی شامل آلاینده‌های محیطی، دود سیگار، مواد سرطانزا و مولکولهای اکسیژن فعال مشتق از نوتروفیل‌های تحت ایسکمی- پرفیوژن مجدد تولید می‌شوند. این رادیکالهای آزاد با اسیدهای چرب غیر اشباع در غشاء سلولی واکنش داده و منجر به شکسته شدن ترکیبات سلولی و نهایتاً تخریب سلول می‌گردند (۲۴). به نظر می‌آید وقتی که ویتامین E جذب بدن می‌شود، در غشاء سلول بافت‌های مختلف با رادیکالهای آزاد و احتمالاً با مواد حد واسط واکنش می‌دهد. به این ترتیب ویتامین E با متوقف کردن واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد غشاء سلولی را حفظ می‌کند (۲۵). بنابراین تعیین میزان تغییرات ویتامین E بافتی و پلاسمایی در طی ایسکمی- پرفیوژن مجدد برای نشان دادن میزان تولید رادیکالهای آزاد، پراکسیداسیون چربی و وضعیت استرس اکسیداتیو در طی پیوند بافتی مهم می‌باشد.

جهت معالجه و پیشگیری از صدمات احتمالی ناشی از قطع خون و برقراری مجدد آن (IR) در سالهای اخیر تمهیداتی در نظر گرفته شده است. گزارشات متعددی دربارهٔ مفید بودن داروهای آنتی‌اکسیدان در جلوگیری از ضایعات وجود دارند (۵). از طرف دیگر روشهایی از قبیل آماده‌سازی بافتی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

ایسکمیک (IPC) در جلوگیری از ضایعات در بافت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته و مؤثر بودن آن نیز مطرح گردیده است (٦،٧).

آماده‌سازی بافتی ایسکمیک عبارت است از بکار بردن دوره‌های کوتاه‌مدت ایسکمی- پرفیوژن مجدد قبل از دوره ایسکمی بلندمدت که در طی این دوره‌های کوتاه‌مدت میانجی‌های شیمیایی نظیر آدنوزین، کاتکول‌آمینها، استیل‌کولین و برادی‌کینین از سلول آزاد می‌شوند. به نظر می‌آید آگونیستهای آدنوزینی و کولینرژیکی به ترتیب به گیرنده وابسته به پروتئین G مهاری و گیرنده‌های کولینرژیکی موسکارینی (M_2) وابسته به پروتئین G متصل شده و موجب فعالیت آنزیم فسفولیپاز C یا D و تشکیل دی‌اسیل‌گلیسرول (DAG) و اینورتیول تری‌فسفات (IP_3) از فسفولیپیدهای غشاء می‌گردد. DAG خود موجب فعال شدن آنزیم PKC می‌شود. به نظر می‌آید فعال شدن PKC عامل کلیدی مهم در مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی در طی IPC باشد زیرا با بکار بردن آنتاگونیستهای PKC توانستند IPC را مهار کنند (١٥).

در مطالعهٔ حاضر نیز نقش IPC بر روی کلیه مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که القاء IPC می‌تواند بافت را برای مقابله با ایسکمی طولانی مدت متعاقب احتمالاً تطبیق دهد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر دوره‌های کوتاه‌مدت متناوب ایسکمی- پرفیوژن مجدد (IPC) قبل از ایسکمی- پرفیوژن مجدد طولانی (IR) بر روی موقعیت آنتی‌اکسیدانی بافت و پلاسمای کلیهٔ موش صحرایی و مقایسهٔ آن با گروه کنترل بوده است. بنابراین میزان ویتامین E بافتی و پلاسمایی به عنوان آنتی‌اکسیدان اندوژن (معیار پراکسیداسیون چربی) توسط دستگاه HPLC پس از استخراج از بافت و پلاسما اندازه‌گیری شد. این مطالعه نشان می‌دهد که میزان ویتامین E در بافت کلیه و پلاسمای ورید کلیه در گروه IPC-IR نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشته ولی نسبت به گروه IR به طور معنی‌داری بیشتر است ($p<$ ٠/٠٠١ و $p<$ ٠/٠١ به ترتیب در بافت و پلاسما) و احتمالاً این بدان معنی است که در اثر آماده‌سازی مقدار ویتامین E توسط بافت مصرف نشده یا اگر مصرف شده به علت خاصیت بازیابی این ویتامین توسط ویتامین C دوباره ساخته شده و جهت مبارزه با اکسیدانهای حاصل از ایسکمی بلندمدت ضمیمه به سیستم وارد شده است و یا از منابع حاوی ویتامین E، ویتامین E به درون گردش خون رها شده است، یا بافت از منابع دیگر برای مبارزه با ایسکمی استفاده کرده است. در حالی که میزان ویتامین E بافتی و پلاسمایی گروه IR نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیر و معنی‌داری دارد (به ترتیب $p<$ ٠/٠٠١ و $p<$ ٠/٠٥). این بدان معنی است که در اثر ایسکمی پرفیوژن مجدد رادیکالهای آزاد اکسیژن در بافت و پلاسمای ورید کلیه تجمع یافته‌اند و بدن برای مبارزه با آن از آنتی‌اکسیدانهای اندوژن خود (ویتامین E به عنوان اندکس پراکسیداسیون چربی) استفاده کرده است.

نتایج مطالعات تاکنون نشان می‌دهند که عمل ویتامین E (α - توکوفرول) ممانعت یا کاستن از تخریب پراکسیداتیو القاء شده توسط رادیکال آزاد در سیستم‌های بیولوژیکی است. زیرا ویتامین E به عنوان اولین یا تنها آنتی‌اکسیدان اندوژن علیه پراکسیداسیون زنجیره‌ای چربی در نظر گرفته می‌شود (٢٦). بنابراین کاهش ویتامین E در پلاسما یا بافت در طی IR می‌تواند مربوط به مصرف آن در موقع پاکسازی رادیکالهای آزاد در غشاء باشد. چنین کاهشی توسط مطالعات متعددی در اندامهای مختلف گزارش گردیده است (٢٦،٢٧).

همچنین میورا و همکارانش در سال ١٩٩٨ گزارش کردند که تعداد دوره‌های IPC در مؤثر بودن آن نقش دارد، زیرا یک دور IPC نتوانست قلب را از حملهٔ ایسکمی حفاظت کند در حالی‌که ایسکمی‌های مکرر توانست اندازهٔ انفارکتوس قلبی را به طور معنی‌داری کاهش دهد (٢٨).

مطالعهٔ حاضر هم نشان داد که سه دورهٔ ایسکمی- پرفیوژن متناوب و مکرر به خوبی توانسته است مانع از کاهش معنی‌دار ویتامین E در بافت و پلاسما گردد. البته ماتئی و همکارانش در سال ٢٠٠٠ اثر IPC را بر روی عضلهٔ اسکلتی بررسی کرده‌اند و مشاهده نموده‌اند که مؤثر بودن IPC فقط به مدت زمان سیکلها بستگی دارد ولی به تعداد آنها وابستگی ندارد. علت این تناقضات می‌تواند مربوط به نوع بافت و سلولهای تحت اثر IPC نیز باشد چنانکه بافتها و سلولهای گوناگون پاسخ‌های متفاوتی به القاء IPC داده‌اند (٢٩).

در این مطالعه مقدار ویتامین E بافت تحت اثر IPC کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان نداد، علت آن هم می‌تواند مصرف نشدن ویتامین E بافتی باشد چنانکه موری و

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

همکارانش در سال ۱۹۸۶ نیز هیچ نوع کاهشی در میزان علت آنرا مربوط به کاهش مصرف ATP به جای تولید اضافی آن دانسته‌اند (۳۰).

از طرف دیگر میزان ویتامین E پلاسمای گروه IPC نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر است. احتمالاً این موضوع می‌تواند علاوه بر کاهش مصرف ویتامین E، مربوط به بازخوانی سریع ویتامین E از منابع متحرک حاوی آن مثل LDL، غشاء گلبولهای قرمز و بافت‌های دیگر (کبد) در اثر عبور خون از آنها باشد (۳۲،۳۱). البته تابحال هیچ گزارشی از سنجش ویتامین E جهت بررسی IPC وجود ندارد. این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شده است، از دستگاه فاز معکوس اندازه‌گیری مایع با کارکرد عالی (HPLC) برای اندازه‌گیری ویتامین E در شرایط مختلف استرس اکسیداتیو استفاده نموده است.

همانطور که بران و همکارانش گزارش کرده‌اند، تغییرات ویتامین E می‌تواند به طور غیر مستقیم نشان‌دهندهٔ پراکسیداسیون چربی در طی IR باشد (۳۳).

فسفاتهای پر انرژی در بافت تحت IPC مشاهده نکرده‌اند.

در مطالعهٔ حاضر هم این موضوع کاملاً مشهود می‌باشد زیرا در گروه IR میزان ویتامین E بافت و پلاسما نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی می‌توان کاربرد آماده‌سازی بافتی را جهت کم کردن آسیب حاصل از رادیکال‌های آزاد قبل یا در شروع پیوند کلیه مطرح نمود. البته بدیهی است که نتیجهٔ قطعی به تحقیقات گسترده‌تر و مطالعاتی بر روی انسان نیاز دارد. همچنین این مطالعه نقش ویتامین E در مبارزه با OFR را بیش از پیش مشخص نموده و اینکه ویتامین E می‌تواند معیار خوبی جهت ارزیابی اثر IPC بر روی بافتهای مختلف و کلیه باشد. در این تحقیق ایسکمی- پرفیوژن مجدد موجب کاهش آنتی‌اکسیدان اندوژن بافتی و پلاسمایی در مقایسه با کنترل گردیده است. ولی ایسکمی‌های کوتاه‌مدت و متناوب قبل از ایسکمی- پرفیوژن مجدد طولانی مدت مانع از کاهش آنتی‌اکسیدان اندوژن بافتی و پلاسمایی ناشی از IR شده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌کنند

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

منابع

1. Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin- 1beta in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. J Surg Res 2001; 99 (l): 134-41.

2. Khanna A, Rossman JE, Fung HL, et al. Intestinal and hemodynamic impairment following mesenteric ischemia / reperfusion. J Surg Res 2001; 99(l): 114-9.

3. Kadkhodaee M, Endre HZ, Tower AR. Hydroxyl radical generation following ischemia-reperfusion in cell-free perfused rat kidney. Biochem Biophys Acta 1995; 1243: 169-174.

4. Linas LS, Whittenburg D, Repine J O_2 metabolites cause reperfusion injury after short but not prolonged renal ischemia. Am J Physiol 1987; 253 (Renal fluid Electrolyte physiol. 22): F685-F691.

5. Baron P. Renal reservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. J Surgical Research 1991; 51: 60-65.

6. Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, et al. Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? Neurology 2000 Jun 13; 54(1l): 2089-94.

7. Roth S, Li B, Rosenbaum PS, et al. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39(5): 777-85.

8. Millar CGM, Woolfson RG, Unwin RJ, et al. Ischaernic preconditioning does not protect the kidney from ischemia reperfusion injury. Nephrol Dial Transplant 1995; 10: 736.

9. Toosy N, McMorris EL, Grace PA, et al. Ischaemic preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury. BJU Int 1999; 84(4): 489-94.

10. Arnuaud J, Fortis I, Blachier S. Simultaneous determination of Retinol. A-tocopherol and b- carotene in serum by isocratic high- performance liquid chromatography (HPLC). J. Chromatogr 1991; 572: 103-116.11. Lang KJ, Gohil K, Packer L. Simultaneous determination of tocopherols, ubiquinols, and ubiquinones in blood, plasma, tissue homogenates, and subcellular fractions. Analyt Bioch 1986; 157: 106-116.

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

13. Peng Y M, Peng YS, Lin y. A non saponification method for the determination of carotenoids, retinoids, and tocopherols in solid human tissues. Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev, 1993; 2: 139-44.

14. Ganiere-Moteil C, Kiergueris MF,Pineau A et al. Determination of plasma and a- tocopherol by HPLC. Ann Biol Clin Paris 1994; 52(7-8): 547-53.

15. Grace PA, Mathie RT. Ischemia-reperfusion injury. London: Black Well Science, 1999.

16. Hems DA, Brosnan JT. Effects of ischemia on content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and post ischemic recirculation. P fleugers Arch 1977; 371: 45-49.

17. Fridovich 1. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J Biol Chern 1970; 254: 4053-57.

18. Kellog E W, Fridovich 1. Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. J Biol Chem 1975; 250: 8812-17.

19. Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, et al. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. Acta Physiol Scand suppl 1980; 492: 91-119.

20. Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, et al. Free radical in cerebral ischemia. Stroke 1978; 9: 445-47.

21. Haramaki N, Stewart DB, Aggarwal S, et al. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by Ischemia-reperfusion. Free Radic Biol Med 1998;; 25(3): 329-339.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

22. Fisher ABT, Dobia C, Aycne I, et al. Ischemia- reperfusion injury to the lung. Ann NY Acad Sci 1994; 723: 197-207.

23. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia- reperfusion tissue injury. Methods Enzymol 1994; 233: 601-10.

24. Niki E, Saito T, kawakami A, et al. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solutions by vitamin E and vitamin C. J Biol Chem 1984; 259: 4177-4182.

25. Yoshikawa T, Yasuda M, Ueda S, et al. Vitamin E in gastric mucosal injury induced by ischemia- reperfusion. Am J Clin Nutr 1991; 53: 2105-45.

26. Miwa K, Igawa A, Nakagawa K, et al. Consumption of vitamin E in coronary circulation in patients with variant angina.Cardio Vasc Res 1999; 41(1)291-8.

27. Kuroda T, Shiohara E. Leukocyte and platelet depletion protects the liver from damage induced by cholestasis and ischemia reperfusion in the dog. Scand J Gastroenterol, 1996; 31(2): 182-90.

28. Miura T, Kawarnura S, et al. Effect of protein kinase C inhibitors on cardioprotection by ischemic preconditioning depends on the number of preconditioning episodes., Cardio Vasc Res 1998; 37(3): 700-9.

29. Liu Y, Gao WD, O'Rourke B, et al. Cell-type specificity of preconditioning in an in vitro model. Basic Res Cardiol 1996; 91(6): 450-7.

30. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74: 1124-36.

31. Combs FG. The vitamins: fundamental aspect in nutrition and Health, second Edition: Academic Press 1998.

32. Perly B, Smith ICP, Hughes L, et al. Estimation of the location of natural α-tocopherol in lipid bilayers by $13_{C\text{-}NMR}$ spectroscopy. Biochem et biophys Acta 1989; 819: 131-135.

33. Bron Am, Moupoilv, Garcher G, et al. Modification of vitamin E during ischemia reperfusion in rat retina. Invest ophthalmol Vis Sci 1995; 36(6): 1084-7.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]