بررسی اثر ویتامین E بر استرس اکسیداتیو و اختلال متابولیسمی ناشی از انسداد حاد و یک‌طرفه میزنای در رت بیهوش

سعید چنگیزی آشتیانی[1*]
سید مصطفی شید موسوی[2]
سامان حسینخانی[3]
مهدی شیرازی[4]

۱- گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اراک
۲- گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
۳- گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس
۴- گروه اورولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

* نویسنده مسئول: اراک، میدان امام خمینی، سردشت. مجتمع آموزشی پردیس، گروه فیزیولوژی
تلفن: ۰۸۶۱۴۱۷۳۵۲۶
email: ashtiyani@sums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۵/۱۴

چکیده

زمینه‌وهدف: نفروپاتی انسدادی همراه با اختلالاتی در وضعیت متابولیسم و تعادل اکسیداتیو در کلیه می‌باشد. استرس اکسیداتیو یک نقش کلیدی در روند پاتوفیزیولوژی بیماری‌های کلیوی دارند. این مطالعه جهت بررسی اثرات ویتامین E، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، بر روی استرس اکسیداتیو و اختلال متابولیسمی ناشی‌از انسداد یک‌طرفه میزنای (UUO) ۲۴ ساعته صورت پذیرفت. ***روش‌بررسی:*** در رت‌های نر اسپراگ- دالی بیهوش شده (n=۱۰ در هر گروه)، میزنای چپ تحت جراحی استریل مسدود گردید. در گروه UUO+NS، نرمال سالین و در گروه‌های UUO+Vit E و UUO+OO به‌ترتیب دی آلفا توکوفرول (۵۰mg/kg)، فعال‌ترین فرم ویتامین E، و حامل آن (روغن زیتون) قبل و بعد از القاء UUO به‌صورت داخل صفاقی تزریق شدند. گروه‌های کنترل و شاهد نیز وجود داشتند. بعد از ۲۴ ساعت از القاء UUO، هر دو کلیه خارج و در $^{\circ}C$ ۸۰- ذخیره شدند. برای تعیین وضعیت متابولیسم، سطوح ATP و ADP، و برای ارزیابی وضعیت اکسیداتیو، سطوح مالون دی آلدئید (MDA) و قدرت احیاءکنندگی آهن سه ظرفیتی (FRAP) کلیه‌ها بررسی گردیدند. ***یافته‌ها:*** مقایسه بین گروه‌های شاهد، UUO+NS و UUO+OO نشان داد که ۲۴ ساعت UUO سبب افزایش MDA ($p<۰/۰۰۱$) و ADP ($p<۰/۰۵$)، اما کاهش FRAP، ATP و نسبت ATP/ADP در کلیه انسدادی شد (همگی $p<۰/۰۰۱$). در گروه UUO+VitE، MDA و FRAP برابر با مقادیر گروه شاهد شدند، در حالی‌که سطوح ATP، ADP و نسبت ATP/ADP هیچ‌تفاوتی را با گروه UUO+OO در کلیه انسدادی نشان ندادند. ***نتیجه‌گیری:*** انسداد یک‌طرفه میزنای ۲۴ساعته سبب کاهش متابولیسم اکسیداتیو و افزایش گونه‌های‌فعال اکسیژن می‌گردد و کاربرد ویتامین E اگرچه به‌طور قابل‌توجهی استرس اکسیداتیو را بهبود بخشید، اما هیچگونه اثری‌را روی متابولیسم هوازی مختل شده در پی نداشت.

کلمات کلیدی: نفروپاتی انسدادی، ویتامین E، استرس اکسیداتیو، متابولیسم، رت.

مقدمه

اگر چه انسداد حاد و یک‌طرفه میزنای Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) یکی از مهمترین مشکلات اورولوژی محسوب می‌گردد، با این‌حال پاتوفیزیولوژی دقیق تغییرات ایجاد شده در آن به‌خوبی شناخته شده نیست. بیشترین اطلاعات درباره مکانیسمی که به‌وسیله آن انسداد میزنای سبب ایجاد اختلالات کلیوی می‌شود از مطالعات مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی به‌دست آمده است. کاهش جریان خون کلیوی، افزایش فشار داخل لگنچه، وجود میانجی‌های موثر عروقی و التهابی، اختلالات متابولیسمی و عملکردی بخشی از عوامل شناخته شده در پاتوفیزیولوژی آسیب در طی انسداد یک‌طرفه میزنای محسوب می‌کردند. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر تاکید بر نقش گونه‌های فعال اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) به‌عنوان یک فاکتور مشارکت کننده در یک گروهی از آسیب‌های بافتی از جمله نفروپاتی انسدادی دارند. اصولا بی‌تعادلی در تولید ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی منجر به آسیب بافتی می‌گردد که می‌تواند به‌وسیله یا افزایش تولید ROS و یا کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و یا هر دو اتفاق بیفتد که در واقع مبین وجود شرایط استرس اکسیداتیو می‌باشد.[1] ROS به‌وسیله تضعیف ساختار و عملکرد غشاء پلاسمایی و غشاءهای داخل سلولی می‌توانند به‌شدت حیات سلولی را به‌مخاطره بیندازند.[2] بررسی احتمال مداخله استرس اکسیداتیو در پاتوژنزیس نفروپاتی انسدادی اخیرا مورد توجه محققین قرار گرفته است. به هر حال اطلاعات موجود در این زمینه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

بسیار محدود است.[۳] اصولاً در طی UUO مجموعه‌ای از تغییرات متابولیکی، عملکردی و ساختاری به‌صورت بی‌تعادلی انرژی، تغییراتی در هومئوستازی سلولی، کاهش تنفس اکسیداتیو، افزایش تنفس بیهوازی، کاهش در میزان تولید ATP و افزایش در سطوح ADP و AMP همراه است.[۵و۴] به‌علاوه، طیف عظیمی از آنزیم‌های متابولیکی و بیان محصولات ژنی در کلیه انسدادی تغییر می‌کنند.[۴] یک کاهش در توانایی تولید ATP ممکن است تا حدودی برای نقص ایجاد شده در عملکرد کلیوی طی UUO دخیل باشد.[۵و۴] در این مطالعه جهت بررسی شرایط استرس اکسیداتیو به‌ترتیب از شاخص Malondialdehyde (MDA) که در واقع فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی توسط ROS بوده و از شاخص Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) به‌عنوان یک پارامتر ارزشمند جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام استفاده شد. همچنین ارزیابی فعالیت متابولیسمی با اندازه‌گیری ATP و ADP و نسبت ATP/ADP در بافت‌های کلیه انسدادی و کلیه طرف مقابل به انجام رسید. با توجه به طیف وسیع آسیب‌های ایجاد شده به‌وسیله ROS در طی UUO، این مطالعه جهت بررسی اثرات دی- آلفا توکوفرول (فعال‌ترین فرم ویتامین E) با اثرات قوی آنتی‌اکسیدانی بر روی استرس اکسیداتیو و اختلالات متابولیسمی ناشی از انسداد حاد یک‌طرفه میزنای در رت طراحی شده است.

روش بررسی

آزمایشات طی سال‌های ۸۵-۱۳۸۳ در بخش فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و بر روی ۵۰ عدد رت نر نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۳۵۰-۲۵۰ گرم، تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز، و در پنج گروه (n=۱۰) صورت پذیرفت. رت‌ها در قفس‌های جداگانه در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در محدوده حرارتی ۲±۲۳ درجه سانتیگراد و دسترسی به مقادیر دلخواه آب و غذا نگهداری می‌شدند. جهت ایجاد انسداد یک‌طرفه میزنای در گروه انسداد یک‌طرفه میزنای دریافت کننده نرمال سالین (UUO+NS)، حیوانات در ابتدا با اتر بیهوش شدند، و سپس یک برش کوچک در ناحیه سوپراپوبیک چپ ایجاد می‌گردید. میزنای چپ در یک سوم بخش دیستال در دو نقطه با نخ چهار صفر سیلک مسدود و سپس ناحیه برش زده شده بخیه می‌شد. همچنین در ساعات قبل و بعد از جراحی تزریق نرمال سالین به‌صورت intraperitoneal (i.p) انجام شد. در گروه شاهد (Sham) تمامی مراحل جراحی جهت مسدود کردن میزنای چپ انجام، ولی میزنای مسدود نمی‌گردید. در گروه کنترل هیچگونه مداخله‌ای نظیر جراحی، تزریق و یا انسداد قبلی صورت نمی‌گرفت. در گروه انسداد یک‌طرفه میزنای دریافت‌کننده ویتامین E (VitE+UUO)، ۵۰mg/kg دی- آلفا توکوفرول (سیگما، آمریکا) شش ساعت قبل و نیز ۹ ساعت بعد از ایجاد UUO در روغن زیتون Olive oil (OO) معمولی حل و بعد از آن به‌صورت داخل پریتوان i.p تزریق شد. همچنین جهت بررسی اثرات حامل مذکور، گروه UUO+OO طراحی شد. کلیه مراحل جراحی به‌صورت استریل انجام شد. حیوانات پس از جراحی جهت ریکاوری به قفس باز گردانده شده و در اختیارشان آب و غذا قرار می‌گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از انسداد در گروه‌های UUO یا معادل انسداد در گروه Sham و همچنین در رت‌های گروه Control (کنترل)، حیوانات با اتر بیهوش شده و با استفاده از کوتر یک برش طولی در ناحیه شکم ایجاد می‌شد. سپس کلیه‌ها سریعاً" از بدن حیوان خارج، در روی یخ خشک دی کپسوله و به دو نیمه تقسیم، در ازت مایع منجمد و نهایتاً" در فریزر $^{\circ}C$ ۸۰- ذخیره می‌گردیدند.

اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی:

Malondialdehyde (MDA): برای تعیین میزان آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو از شاخص MDA که فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی توسط ROS است کمک گرفته شده و میزان آن در بافت کلیوی با استفاده از روش Ohkawa مشخص می‌گردید.[۶] به‌طور خلاصه، ابتدا بعد از خارج کردن بافت کلیوی از فریزر و توزین آن، بافر فسفاتی به نسبت یک به ۱۰ (W/V) اضافه شده و سپس با کمک هموژنایزر یک محلول همگن تهیه می‌گردید. اسید تری کلرواستیک اسید (TCA) و تیوباربیتوریک اسید (TBA) به این محلول همگن اضافه می‌شد تا واکنش MDA با تیوباربیتوریک اسید در دمای $^{\circ}C$ ۱۰۰- ۹۵ و در pH= ۳/۵ انجام گردد. بعد از تشکیل یک کمپلکس صورتی رنگ و استخراج آن با ان- بوتانول، جذب در ۵۳۲nm با دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین و با منحنی استاندارد تترامتوکسی پروپان مقایسه و مقدار عددی بر حسب nmol/gKW گزارش می‌گردید.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP): اندازه‌گیری FRAP از سال ۱۹۹۶ یکی از رایج‌ترین روش‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام محسوب می‌شود که به‌واسطه سادگی، حساسیت و ارزانی به

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

سرعت جایگاه خود را در بین محققین پیدا کرده است. این روش بر اساس توانایی مایعات بافتی در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) در حضور ماده‌ای بنام TPTZ (Tripyridyl-S-Triazine) استوار است. میزان قدرت احیاکنندگی مایعات بافتی از طریق افزایش میزان غلظت کمپلکس $TPTZ\text{-}Fe^{2+}$ آبی رنگ توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. اندازه‌گیری FRAP بر اساس روش Benize در نمونه‌های بافتی صورت پذیرفت.[۷] به‌طور خلاصه در ابتدا معرف FRAP با ترکیب کردن بافراستات، TPTZ و $FeCl_3.6H_2O$ تهیه شد و سپس ۵۰µL از بافت همگن به آن اضافه، و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی $37^{\circ}C$ قرار داده می‌شد. میزان جذب نوری ایجاد شده در ۵۹۳nm خوانده و با منحنی استاندارد حاصل از محلول $FeCl_3.6H_2O$ مقایسه و مقدار عددی برحسب µmol/gKW گزارش می‌گردید.

وضعیت متابولیسم: اندازه‌گیری سطوح Adenosine Triphosphate (ATP) و Adenosine Diphosphate (ADP) در بافت کلیوی بر اساس روش Lundine صورت گرفت.[۸] به‌طور خلاصه در ابتدا با استفاده از هموژنایزر، محلول همگن از بافت کلیوی به نسبت یک به ۱۰ (W/V) با TCA در ورای پوششی از یخ تهیه می‌شد. بعد از خنثی کردن محلول با بافر فسفاتی و رساندن pH به حدود ۷/۵–۷، ۱۰µl از نمونه همگن شده به مخلوطی از آنزیم لوسیفراز و لوسیفرین اضافه می‌گردید. میزان ATP موجود در نمونه، بر اساس مقدار نور لومینسنس متصاعد شده بلافاصله با دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری می‌شد. سپس به همان میزان فوق‌الذکر از نمونه همگن شده، مخلوطی از فسفوانول پیروات و پیروات کیناز اضافه و بعد از گذشت شش دقیقه در درجه حرارت اتاق، تمام ADP موجود در نمونه به ATP تبدیل می‌گردید. به این محلول نیز مخلوط آنزیمی لوسیفراز و لوسیفرین به‌سرعت اضافه شده و میزان ATP دوم را معین نموده و با تفریق عدد به‌دست آمده دومی از عدد اول مقدار ADP معلوم می‌گردید. لازم به ذکر است که مقادیر به‌دست آمده ATP در هر دو مرحله با منحنی استاندارد ATP مقایسه و مقدار عددی بر حسب µmol/gKW گزارش می‌شد. مقادیر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و متابولیسمی به‌صورت میانگین ± خطای معیار (Mean± SE) ارائه و کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ویراست ۱۱/۵ و با در نظر گرفتن $p<0/05$، انجام پذیرفتند. جهت مقایسه درون گروهی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و متابولیسم و نیز پارامترهای عملکرد کلیوی بین کلیه راست و کلیه چپ از روش paired-t-test و برای مقایسه بین گروهی تمامی این پارامترها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه با Duncan-post hoc و برای تعیین میزان دقیق معنی‌دار بودن از آزمون LSD استفاده شد.

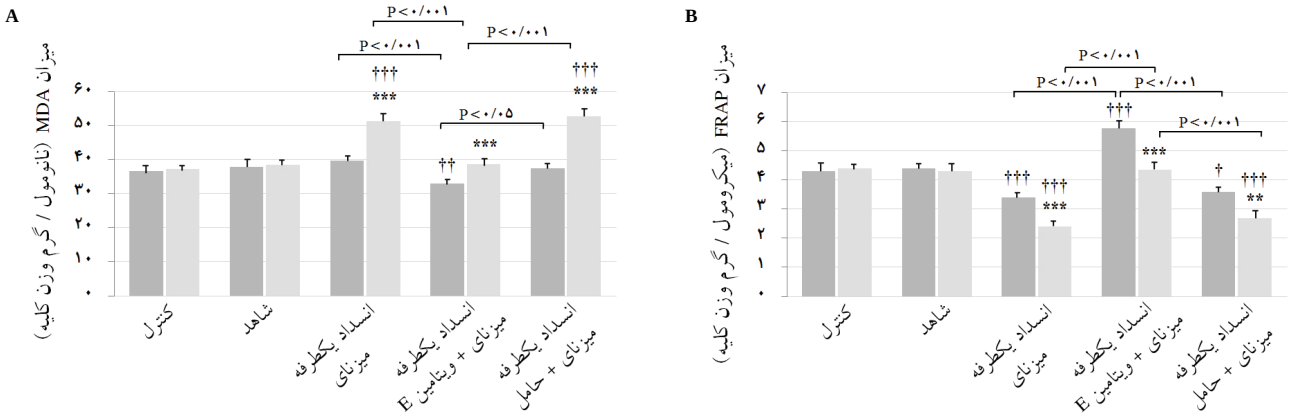
یافته‌ها

جدول ۱ و نمودارهای ۱A و ۱B به‌ترتیب تغییرات در مقادیر MDA و FRAP را در کلیه‌های راست و چپ در گروه‌های مختلف مورد مطالعه ضمن ۲۴ ساعت UUO نشان می‌دهد. میزان تغییرات در پارامترهای شاخص عملکرد متابولیسمی (ATP/ADP, ADP, ATPT) طی UUO حاد در گروه‌های مختلف به‌ترتیب در جدول ۲ و نمودارهای A-C ۲ نشان داده شده است.

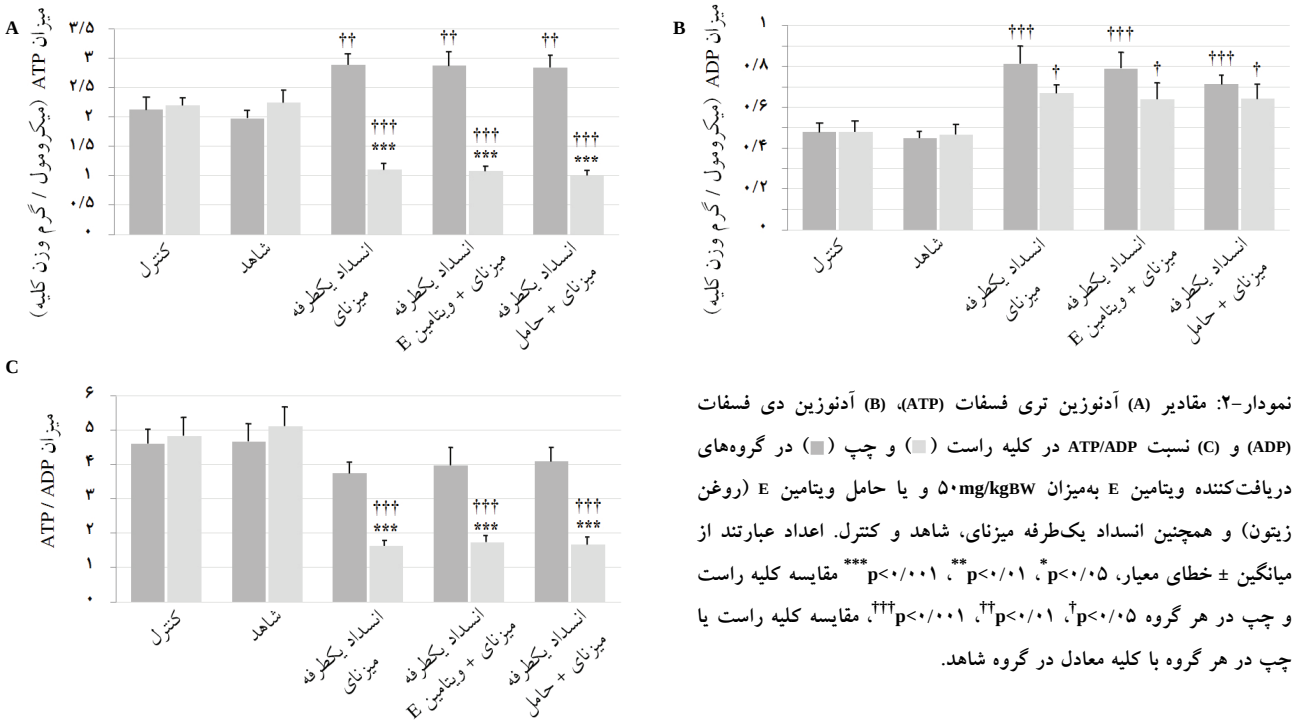
بحث

کلیه‌ها از جمله بافت‌هایی هستند که به‌خودی خود ROS را در طی متابولیسم اکسیداتیو تولید و به‌نوبه خود مستعد آسیب ناشی از اثرات آنها نیز هستند. چنانچه میزان تولید ROS به‌طور واضحی در کلیه افزایش یابد می‌تواند در شروع و یا توسعه آسیب‌های حاد کلیوی مشارکت داشته باشد.[۲] به‌طور کلی دامنه آسیب‌های ناشی از انسداد حاد یک‌طرفه میزنای بسیار وسیع بوده، به‌نحوی‌که نه تنها مسبب آسیب‌های عملکردی و بافتی می‌گردد بلکه همچنین تغییرات قابل توجهی در متابولیسم و تولید انرژی در آن نیز به‌جای می‌گذارند.[۹] اولین بار Modi و همکاران وجود شرایط استرس اکسیداتیو و افزایش تولید کلیوی ROS را در انسداد یک‌طرفه و دوطرفه میزنای در رت نشان دادند.[۱۰] نتایج حاصل از این تحقیق نیز برای اولین بار نشان داد که ۲۴ ساعت UUO سبب یک افزایش معنی‌داری در میزان MDA بافتی در کلیه انسدادی به‌همراه یک کاهش معنی‌داری در میزان FRAP در هر دو کلیه می‌نماید، که در واقع به‌معنای وجود شرایط استرس اکسیداتیو می‌باشد (نمودارهای ۱A و ۱B). مفهوم اندازه‌گیری FRAP آن است که وجود آنتی اکسیدان‌های بیولوژیک به‌طور معنی‌داری اکسیداسیون سوبسترا را به تاخیر انداخته و یا ممانعت می‌نمایند. به‌عبارت دیگر آنتی اکسیدان‌ها گونه‌های اکسید کننده را احیاء می‌کنند. بنابراین قدرت آنتی‌اکسیدانی کل ممکن است تعبیر دیگری از قدرت احیا کنندگی کل باشد.[۱۱] در گروه UUO+NS مقدار FRAP

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]



نمودار-۱: مقادیر (A) مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و (B) توانایی آنتی‌اکسیدانی/ احیاء کنندگی آهن سه‌ظرفیتی (FRAP) در کلیه راست (▒) و چپ (■) در گروه‌های دریافت‌کننده ویتامین E به‌میزان ۵۰mg/kgBW و یا حامل ویتامین E (روغن‌زیتون) و همچنین انسداد یک‌طرفه میزنای، شاهد و کنترل. اعداد عبارتند از میانگین ± خطای معیار، $p<۰/۰۵^{*}$، $p<۰/۰۱^{**}$، $p<۰/۰۰۱^{***}$مقایسه کلیه راست و چپ در هر گروه، $p<۰/۰۵^{\dagger}$، $p<۰/۰۱^{\dagger\dagger}$، $p<۰/۰۰۱^{\dagger\dagger\dagger}$، مقایسه کلیه راست یا چپ در هر گروه با گروه شاهد معادل.



نمودار-۲: مقادیر (A) آدنوزین تری فسفات (ATP)، (B) آدنوزین دی فسفات (ADP) و (C) نسبت ATP/ADP در کلیه راست (▒) و چپ (■) در گروه‌های دریافت‌کننده ویتامین E به‌میزان ۵۰mg/kgBW و یا حامل ویتامین E (روغن زیتون) و همچنین انسداد یک‌طرفه میزنای، شاهد و کنترل. اعداد عبارتند از میانگین ± خطای معیار، $p<۰/۰۵^{*}$، $p<۰/۰۱^{**}$، $p<۰/۰۰۱^{***}$ مقایسه کلیه راست و چپ در هر گروه $p<۰/۰۵^{\dagger}$، $p<۰/۰۱^{\dagger\dagger}$، $p<۰/۰۰۱^{\dagger\dagger\dagger}$، مقایسه کلیه راست یا چپ در هر گروه با کلیه معادل در گروه شاهد.

جدول-۱: مقایسه مقادیر مربوط به شاخص‌های استرس اکسیداتیو طی ۲۴ساعت انسداد یک‌طرفه میزنای در نمونه‌های بافت کلیوی

پارامترها	کنترل		شاهد		انسداد یکطرفه میزنای+ نرمال سالین		انسداد یکطرفه میزنای+ ویتامین E		انسداد یکطرفه میزنای+ روغن زیتون	
	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK
MDA	۱/۶±۳۶/۸	۱/۰±۳۷/۱	۱/۴±۳۸/۲	۱/۰±۳۸/۶	۰/۹±۳۹/۸ ###	۱/۹±۵۱/۴ ###.††† ***	۱/۳±۳۳/۱ ††	۱/۴±۳۸/۶ ***	۱/۱±۳۷/۴ #	۱/۸±۵۲/۹ ###.††† ***
FRAP	۰/۲۵±۴/۳۰	۰/۱۶±۴/۴۰	۰/۲۲±۴/۳۴	۰/۲۷±۴/۲۸	۰/۱۴±۳/۴۱ ###	۰/۱۶±۲/۴۴ ###.††† ***	۰/۳۱±۵/۷۳ †††	۰/۲۷±۴/۳۶ ***	۰/۱۳±۳/۵۸ ###	۰/۱۷±۲/۶۶ ###.††† ***

MDA = Malondialdehyde, FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power

$p<۰/۰۵^{*}$، $p<۰/۰۱^{**}$، $p<۰/۰۰۱^{***}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) با LK (کلیه چپ) با یکدیگر در هر دوره.

$p<۰/۰۵^{\dagger}$، $p<۰/۰۱^{\dagger\dagger}$، $p<۰/۰۰۱^{\dagger\dagger\dagger}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) با گروه شاهد مربوطه در هر دوره.

$p<۰/۰۵^{\#}$، $p<۰/۰۱^{\#\#}$، $p<۰/۰۰۱^{\#\#\#}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) گروه UUO+VitE با سایر گروه‌های انسدادی.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

جدول-۲: مقایسه مقادیر مربوط به شاخص‌های متابولیسمی طی ۲۴ساعت انسداد یک‌طرفه میزنای در نمونه‌های بافت کلیوی

پارامترها	کنترل		شاهد		انسداد یکطرفه میزنای+ نرمال سالین		انسداد یکطرفه میزنای+ ویتامین E		انسداد یکطرفه میزنای+ روغن زیتون	
	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK
ATP (µmol/gKW)	۲/۱۴±۰/۲۴	۲/۲۰±۰/۱۷	۱/۹۹±۰/۱۴	۲/۲۶±۰/۱۹	۱/۰۹±۰/۱۰ ††† ***	۲/۹۱±۰/۱۶ ††† ***	۲/۸۹±۰/۲۳ ††	۱/۰۶±۰/۱۳ ††† ***	۱/۰۲±۰/۰۸ ††	۲/۸۶±۰/۲۳ ††† ***
ADP (µmol/gKW)	۰/۴۸±۰/۰۴	۰/۴۸±۰/۰۵	۰/۴۵±۰/۰۴	۰/۴۷±۰/۰۵	۰/۶۷±۰/۰۴ †††	۰/۸۲±۰/۰۸ †	۰/۶۴±۰/۰۹ †††	۰/۷۹±۰/۰۷ †	۰/۶۵±۰/۰۶ †††	۰/۷۲±۰/۰۴ †
ATP/ADP	۴/۶۱±۰/۴۳	۴/۸۴±۰/۵۳	۴/۶۶±۰/۵۳	۵/۱۱±۰/۵۶	۱/۶۴±۰/۱۴	۳/۷۳±۰/۳۱ ††† ***	۱/۷۴±۰/۱۷	۳/۹۶±۰/۵۳ ††† ***	۱/۶۷±۰/۱۹	۴/۰۷±۰/۴۲ ††† ***

ATP = Adenosine Triphosphate, ADP = Adenosine Diphosphate

$p<0/05$*، $p<0/01$**، $p<0/001$*** مقایسه بین RK (کلیه راست) با LK (کلیه چپ) با یکدیگر در هر دوره.

$p<0/05$†، $p<0/01$††، $p<0/001$††† مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) با گروه شاهد مربوطه در هر دوره.

$p<0/05$#، $p<0/001$##، $p<0/001$### مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) گروه UUO+VitE با سایر گروه‌های انسدادی.

در کلیه غیرانسدادی طرف مقابل نیز نسبت به کلیه انسدادی و نیز نسبت به کلیه‌های گروه شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (نمودار 1B)، این موضوع مطابق با نتایج سایر محققینی است که افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در کلیه طرف مقابل نشان داده‌اند، این یافته‌ها در واقع مطابق با مفهوم Renal counter balance است که در آن کلیه غیرانسدادی طرف مقابل یک تغییر سازشی را متحمل می‌گردد.[1] استرس اکسیداتیو افزایش یافته سبب تهی شدن منابع آنتی‌اکسیدان‌های سلولی نظیر گلوتاتیون و ویتامین E می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که UUO حاد از طریق افزایش تولید ROS و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث بروز استرس اکسیداتیو در کلیه انسدادی شده است.[10و1] محققین عمده‌ترین دلایل افزایش تولید ROS در کلیه انسدادی را کاهش خون‌رسانی و افزایش فشار داخل توبولی ذکر می‌نمایند.[12] در حالی‌که کلیه غیرانسدادی که به‌واسطه فعالیت جبرانی و افزایش عملکردی احتمالا با افزایش تولید ROS همراه است با تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی که باعث هزینه شدن از آن و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام شده است، از بروز استرس اکسیداتیو و افزایش MDA بافتی در این کلیه جلوگیری کرده است.[13] در این مطالعه UUO حاد سبب کاهش شدید در تولید ATP (نمودار 2A) به‌همراه افزایش در سطح ADP (نمودار 2B) در کلیه انسدادی شد. کاهش در ATP ممکن است مربوط به تغییراتی در عملکرد غشاء میتوکندری، یا مهار فسفوریلاسیون اکسیداتیو باشد.[14] نتایج مطالعات انجام‌شده به‌وسیله Needleman و همکاران بر روی متابولیسم در کلیه انسدادی در رت نشان داد که برش‌های مدولای کلیوی از یک سرعت گلیکولیز نسبتاً″ بالا و مصرف اکسیژن نسبتاً پائین برخوردارند. این نتایج پیشنهاد کننده آن است که کلیه انسدادی برای تامین انرژی خود شدیداً″ به متابولیسم بیهوازی وابسته است.[15] محدودیت سرعت تولید ATP به‌وسیله میتوکندری در کلیه انسدادی به‌نوبه خود منجر به کاهش پتانسیل فسفریلاسیون اکسیداتیو و کاهش نسبت ATP/ADP خواهد شد که به‌خوبی با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (نمودار 2C). از طرف دیگر افزایش سطح ATP در کلیه غیرانسدادی (نمودار 2A) به احتمال زیاد ناشی از افزایش بار کاری جبرانی این کلیه به‌واسطه کم کاری کلیه انسدادی و لذا افزایش میزان متابولیسم اکسیداتیو در آن می‌باشد. همچنین افزایش میزان ADP در کلیه غیرانسدادی (نمودار 2B) موید این است که علیرغم افزایش تولید ATP، میزان مصرف هم بالا است که منجر به افزایش تجمعی ADP شده است. البته عدم تغییر در نسبت ATP/ADP کلیه غیرانسدادی (نمودار 2C) حاکی از وجود یک شرایط متابولیسمی نرمال در این کلیه است. بنابراین در طی انسداد حاد میزنای، کلیه غیرانسدادی با یک افزایش فعالیت متابولیسم اکسیداتیو جبرانی اما طبیعی مواجه است که همراه با افزایش در میزان تولید ATP از یک‌طرف و افزایش مصرف آن (افزایش تشکیل ADP) از طرف دیگر روبروست. کاهش ظرفیت تولید ATP ممکن است ناشی از اختلالات به‌وجود آمده در جامعیت ساختاری و عملکردی میتوکندری به‌دنبال UUO باشد.[14] مطالعات انجام شده با کمک میکروسکوپ الکترونی در طی UUO حاد حکایت از هم گسیختگی در میتوکندری‌ها به‌همراه از دست دادن ظرفیت اکسیداتیو آنها می‌باشد.[4] کلیه انسدادی در گروه UUO+OO همانند گروه UUO+NS، دارای افزایش ۳۷ درصد در میزان MDA (نمودار 1A) و کاهش ۳۸ درصد در سطح FRAP (نمودار 2A) نسبت به کلیه معادل گروه Sham-U بوده است. بنابراین، UUO ۲۴ ساعته در گروه UUO+OO با همان مکانیزم‌هایی که در گروه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

UUO+NS ذکر گردید توانسته است از طریق هم افزایش تولید ROS و هم کاهش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در کلیه انسدادی باعث برقراری شرایط استرس اکسیداتیو شود. ویتامین E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غشایی که مهمترین فرم آن آلفا- توکوفرول می‌باشد می‌تواند رادیکال‌های آزاد تشکیل شده در غشاء و همچنین رادیکال-های اکسیژن محیط آبی اطراف‌غشاء را گرفته و به‌صورت سینرژستیک با مکانیزم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث حذف رادیکال‌های آزاد شده و با بروز استرس اکسیداتیو مقابله نماید.[۱۶] استفاده از ویتامین E در این مطالعه در رت‌های مبتلا شده به UUO در گروه UUO+VitE نسبت به گروه UUO+OO باعث گردید تا در کلیه انسدادی میزان بافتی MDA کمتر و FRAP بیشتر شده تا به مقادیر برابر با کلیه معادل گروه شاهد برسند. بنابراین، تجویز ویتامین E از قبل و بعد از القای UUO ۲۴ ساعته توانسته است از بروز استرس اکسیداتیو به‌طور کامل در کلیه انسدادی جلوگیری نماید. در کلیه غیرانسدادی گروه UUO+OO، دقیقاً همانند گروه UUO+NS، افزایش فعالیت جبرانی که با بالا رفتن تولید ROS همراه بوده است توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و هزینه شدن از آن مقابله شده است، که همین امر منجر به کاهش ۱۷ درصدی در سطح FRAP (نمودار ۲A) گردید. اما، از بروز استرس اکسیداتیو و در نتیجه افزایش میزان MDA در کلیه غیرانسدادی جلوگیری شد (نمودار ۱A). در کلیه غیرانسدادی گروه UUO+VitE، نه تنها مقادیر MDA کاهش و FRAP افزایش را نسبت به گروه UUO+OO نشان دادند، بلکه نسبت به کلیه معادل در گروه شاهد هم MDA ۱۳ درصد کمتر و FRAP ۳۲ درصد بالاتر شدند (نمودارهای ۱A و ۲A). بنابراین، میزان ویتامین E تجویز شده در این مطالعه در حدی بود که با توجه به افزایش کمتر تولید ROS در کلیه غیرانسدادی نسبت به انسدادی، توانسته است با تقویت شدید قدرت آنتی‌اکسیدانی میزان ROS را در کلیه غیرانسدادی حتی به پایین‌تر از حد نرمال برساند که هماهنگ با مطالعات سایر محققین است یعنی دی- آلفا توکوفرول با رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن واکنش داده و از آسیب ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی ممانعت می‌نماید. دی- آلفا توکوفرول همچنین می‌تواند سطوح رادیکال‌های آزاد را کاهش و سیستم آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد.[۱۷] در گروه UUO+OO، نقص متابولیسم انرژی ایجاد شده بر اثر ۲۴ ساعت UUO کاملاً شبیه به گروه UUO+NS بود. به‌طوری‌که در کلیه انسدادی نسبت به کلیه معادل گروه شاهد مقادیر ATP کاهش (نمودار ۲A) و ADP افزایش (نمودار ۲B) یافتند که منجر به افت نسبت ATP/ADP (نمودار ۲C) شدند. اما در کلیه غیرانسدادی جهت تامین انرژی فعالیت‌های افزایش یافته جبرانی، متابولیسم اکسیداتیو به‌طور طبیعی بیشتر گردید و لذا با افزایش تولید ATP (نمودار ۲A) از یک‌سو و افزایش مصرف شدن آن از سوی دیگر باعث بالا رفتن سطح ADP (نمودار ۲B) شد، ولی در هر حال میزان نسبت ATP/ADP ثابت مانده (نمودار ۲C) و نسبت به کلیه معادل در گروه شاهد تفاوتی را نشان نداد. از طرف دیگر مقایسه این پارامترها بین گروه‌های UUO+OO و UUO+VitE هیچگونه تفاوتی را در هر دو کلیه نشان نمی‌دهد که حاکی از عدم اثر ویتامین E بر روی متابولیسم انرژی مختل شده توسط UUO حاد می‌باشد. به‌علاوه نکته قابل توجه آن است که استفاده از ویتامین E توانست استرس اکسیداتیو حاصل از UUO حاد را در کلیه انسدادی به‌طور کامل برطرف نماید، و در کلیه غیرانسدادی هم سطح ROS را از حد نرمال کمتر نماید. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نه تنها افزایش میزان ROS و بروز استرس اکسیداتیو در برقراری اختلال در مکانیزم‌های متابولیسم اکسیداتیو در کلیه انسدادی نقش ندارند، بلکه در تنظیم متابولیسم هوازی نرمال در کلیه غیرانسدادی هم دارای اهمیت نمی‌باشند. البته می‌توان با رد این نتیجه‌گیری، عنوان نمود که ویتامین E به‌علت عدم امکان دسترسی به میتوکندری نتوانسته است شرایط استرس اکسیداتیو در آن را بهبود بخشد و در نتیجه اختلالات متابولیسم هوازی حاصله را بر طرف نماید. سایر مطالعات نشان داده‌اند که حذف رادیکال‌های آزاد به‌وسیله ویتامین E روی فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیک موجود در سیتوزول اثر می‌گذارند، زیرا آنزیم‌های مذکور توسط رادیکال‌های آزاد مهار شده بودند. لازم به‌ذکر است که عدم تفاوت بین گروه‌های کنترل و شاهد در مقادیر پارامترهای اندازه‌گیری شده نشان دهنده آن است که بیهوشی، جراحی، تزریق آنتی‌بیوتیک‌ها و دوره ریکاوری تاثیری بر روی تعادل اکسیداتیو و وضعیت متابولیسم کلیوی نداشته‌اند. در کل براساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان عنوان نمود که انسداد ۲۴ ساعته یک‌طرفه میزنای باعث برقراری استرس اکسیداتیو و نقص در متابولیسم هوازی در کلیه انسدادی، به‌همراه یک افزایش جبرانی در متابولیسم هوازی و بدون بروز استرس اکسیداتیو در کلیه غیرانسدادی می‌شود. استفاده از دی- آلفا توکوفرول اگرچه به‌طور قابل‌توجهی

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

استرس اکسیداتیو را بهبود بخشید و تاثیری در اختلال متابولیسمی نداشت. *سپاسگزاری:* بدینوسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی فارس که در حمایت مالی در اجرای این طرح ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم.

References

1. Kinter M, Wolstenholme JT, Thornhill BA, Newton EA, McCormick ML, Chevalier RL. Unilateral ureteral obstruction impairs renal antioxidant enzyme activation during sodium depletion. *Kidney Int* 1999; 55: 1327-34.
2. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 2000; 109: 665-78.
3. Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, et al. Increased oxidative stress in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 1999; 56: 1004-13.
4. Tannenbaum J, Purkerson ML, Klahr S. Effect of unilateral ureteral obstruction on metabolism of renal lipids in the rat. *Am J Physiol* 1983; 245: F254-62.
5. Blondin J, Purkerson ML, Rolf D, Schoolwerth AC, Klahr S. Renal function and metabolism after relief of unilateral ureteral obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 150: 71-6.
6. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
7. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299: 15-27.
8. Lundin A**,** Thore A. Analytical information obtainable by evaluation of the time course of firefly bioluminescence in the assay of ATP. *Anal Biochem* 1975; 66: 47-63.
9. Young MR, Young IS, Johnston SR, Rowlands BJ. Lipid peroxidation assessment of free radical production following release of obstructive uropathy. *J Urol* 1996; 156: 1828-32.
10. Modi KS, Schreiner GF, Purkerson ML, Klahr S. Effects of probucol in renal function and structure in rats with subtotal kidney ablation. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 310-7.
11. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299: 15-27.
12. Sinik Z, Turan T, Demir S, Yilmaz U, Sert S, Aybek Z. The effect of partial unilateral ureteral obstruction release and allopurinol on the renal malondialdehyde and glutathione levels. *Int J Urol* 2005; 12: 990-3.
13. Ashtiyani SC, Moosavi SMS, Hosseinkhani S, Shirazi M. Metabolic and oxidative stress indices in acute unilateral ureteral obstructive nephropathy in rat. *TUMJ* 2007; 65: 17-23.
14. Du Y, Ko KM. Effects of emodin treatment on mitochondrial ATP generation capacity and antioxidant components as well as susceptibility to ischemia-reperfusion injury in rat hearts: single versus multiple doses and gender difference. *Life Sci* 2005; 77: 2770-82.
15. Nito H, Descoeudres C, Kurokawa K, et al**.** Effect of unilateral obstruction on renal cell metabolism and function. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 60-71.
16. Packer L. Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 271-6.
17. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 4-15.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 9, Dec 2008: 617-624

The effects of vitamin-E on oxidative stress and metabolic imbalance induced by acute unilateral ureteral obstruction in anaesthetized rats

Ashtiyani S.C.[1*]
Moosavi S.M.S.[2]
Hosseinkhani S.[3]
Shirazi M.[4]

1- Department of Physiology, Arak University of Medical Sciences
2- Department of Physiology, Shiraz University of Medical Sciences
3- Department of Biochemistry, Tarbiat Modares University
4- Department of Urology, Shiraz University of Medical Sciences

Received: July 16, 2008 Accepted: August 04, 2008

Abstract

Background: Obstructive nephropathy has been associated with disorders in metabolism state and oxidative balance of kidney. Stress oxidative play a key role in the pathophysiological processes of renal diseases. The objective of this study was to investigate effects of vitamin-E, as a powerful antioxidant, on renal oxidative stress and metabolism defect induced by 24-hr unilateral ureteral obstruction (UUO).

Methods: Anesthetized male Sprague-Dawley rats (n=10 in each group) were sterilely operated to occlude the left ureter. In UUO+NS, we had a single dose normal saline injection and in UUO+VitE and UUO+OO groups, D-α-tocopherol (50 mg/kg), the main component of vitamin-E, and its vehicle (Olive Oil), respectively, were twicely infused I.P. before and after UUO-induction. There were also sham-operated and control groups. 24-hr after of UUO-induction, both kidneys were removed and stored in -70°C. To determine metabolism condition, the levels of ATP and ADP; and to evaluate redox state, the levels of malondialdehyde (MDA) and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) of kidneys were assessed.

Results: The comparisons between UUO+NS and sham groups indicated that UUO increased MDA ($p<0.001$) and ADP ($p<0.05$), but decreased FRAP, and ATP/ADP ratio in obstructed kidney (all $p<0.001$). In UUO+VitE group, MDA and FRAP were equal to their levels in sham group, while ATP, ADP and ATP/ADP ratio were not different from those of UUO+NS group in obstructed kidney.

Conclusion: Twenty four hour of UUO caused renal reduction in oxidative metabolism and elevations in reactive oxygen species; and administration of vitamin-E, although considerably ameliorated the oxidative stress, could not improve the defected metabolism.

Keywords: Obstructive nephropathy, vitamin E, stress oxidative, metabolism, rat.

[*] Corresponding author: Dept. of Physiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN
Tel: +98-861-4173526
email: ashtiyani@sums.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-18]