

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

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

چکیده

زمینه و هدف: 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 ناشی از انسداد یک‌طرفه میزنای (UUO) ۲۴ ساعته صورت پذیرفت. **روش بررسی:** 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 به ترتیب دی‌آلفا 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 ۸۰°C ذخیره شدند. برای تعیین وضعیت متابولیسم، سطوح ATP و ADP، و برای ارزیابی وضعیت اکسیداتیو، سطوح مالون دی‌آلدئید (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<۰/۰۰۵)، اما کاهش ATP، FRAP، 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 حالی که سطوح ATP، ADP و نسبت ATP/ADP هیچ تفاوتی را با گروه UUO+OO در کلیه انسدادی نشان ندادند. **نتیجه‌گیری:** انسداد یک‌طرفه میزنای ۲۴ ساعته سبب کاهش متابولیسم اکسیداتیو و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد و کاربرد ویتامین E اگرچه به‌طور قابل‌توجهی استرس اکسیداتیو را بهبود بخشید، اما هیچگونه اثری را روی متابولیسم هوازی مختل شده در پی نداشت.

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

سعید چنگیزی آشتیانی^{*۱}

سید مصطفی شید موسوی^۲

سامان حسینخانی^۳

مهدی شیرازی^۴

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: ۰۸۶۱۴۱۳۵۲۶

email: ashtiyani@sums.ac.ir

مقدمه

تاکید بر نقش گونه‌های فعال اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) به‌عنوان یک فاکتور مشارکت‌کننده در یک گروهی از آسیب‌های بافتی از جمله نفروپاتی انسدادی دارند. اصولاً بی‌تعادلی در تولید ROS و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی 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.^۱ ROS به‌وسیله تضعیف ساختار و عملکرد غشاء پلاسمایی و غشاءهای داخل سلولی می‌تواند به‌شدت حیات سلولی را به‌مخاطره بیندازد.^۲ بررسی احتمال مداخله استرس اکسیداتیو در پاتوژنیز نفروپاتی انسدادی اخیراً مورد توجه محققین قرار گرفته است. به هر حال اطلاعات موجود در این زمینه

اگر چه انسداد حاد و یک‌طرفه میزنای Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) یکی از مهمترین مشکلات اورولوژی محسوب می‌گردد، با این حال 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 می‌گردند. مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر

به صورت intraperitoneal (i.p) انجام شد. در گروه شاهد (Sham) تمامی مراحل جراحی جهت مسدود کردن میزناهی چپ انجام، ولی میزناهی مسدود نمی‌گردید. در گروه کنترل هیچگونه مداخله‌ای نظیر جراحی، تزریق و یا انسداد قبلی صورت نمی‌گرفت. در گروه انسداد یک‌طرفه میزناهی 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 به صورت داخل پریتون i.p تزریق شد. همچنین جهت بررسی اثرات حامل مذکور، گروه UUO+OO طراحی شد. کلیه مراحل جراحی به صورت 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 80°C - 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. به طور 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 هموزنایزر 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 100°C - ۹۵ و در $\text{pH} = 3/5$ انجام گردد. بعد از تشکیل یک کمپلکس صورتی رنگ و استخراج آن با آن- بوتانول، جذب در 532nm 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 به واسطه سادگی، حساسیت و ارزانی به

بسیار محدود است.^۳ اصولاً در طی UUO مجموعه‌ای از تغییرات متابولیکی، عملکردی و ساختاری به صورت 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.^۴ به علاوه، 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.^۴ در این مطالعه جهت بررسی شرایط استرس اکسیداتیو به ترتیب از شاخص Malondialdehyde (MDA) که در واقع فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی توسط ROS بوده و از شاخص Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) به عنوان یک پارامتر ارزشمند جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام استفاده شد. همچنین ارزیابی فعالیت متابولسمی 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 به وسیله 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 متابولسمی ناشی از انسداد حاد یک‌طرفه میزناهی 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 ($n=10$) صورت پذیرفت. رت‌ها در قفس‌های جداگانه در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در محدوده حرارتی 23 ± 2 درجه سانتیگراد و دسترسی به مقادیر دلخواه آب و غذا نگهداری می‌شدند. جهت ایجاد انسداد یک‌طرفه میزناهی در گروه انسداد یک‌طرفه میزناهی دریافت‌کننده نرمال سالین (UUO+NS)، حیوانات در ابتدا با اتر بیهوش شدند، و سپس یک برش کوچک در ناحیه سوپراپوبیک چپ ایجاد می‌گردید. میزناهی 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

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 یک طرفه با Duncan-post hoc و برای تعیین میزان دقیق معنی دار بودن از آزمون LSD استفاده شد.

یافته‌ها

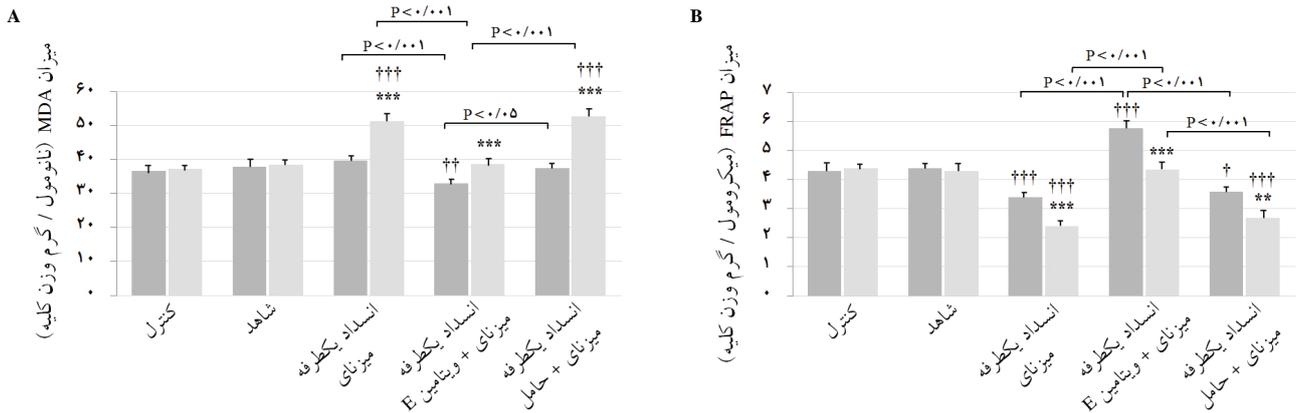
جدول ۱ و نمودارهای ۱A و ۱B به ترتیب تغییرات در مقادیر MDA و FRAP را در کلیه‌های راست و چپ در گروه‌های مختلف مورد مطالعه ضمن ۲۴ ساعت UUO نشان می‌دهد. میزان تغییرات در پارامترهای شاخص عملکرد متابولیسمی (ATP/ADP, ADP, ATPT) طی UUO حاد در گروه‌های مختلف به ترتیب در جدول ۲ و نمودارهای A-C ۲ نشان داده شده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

بحث

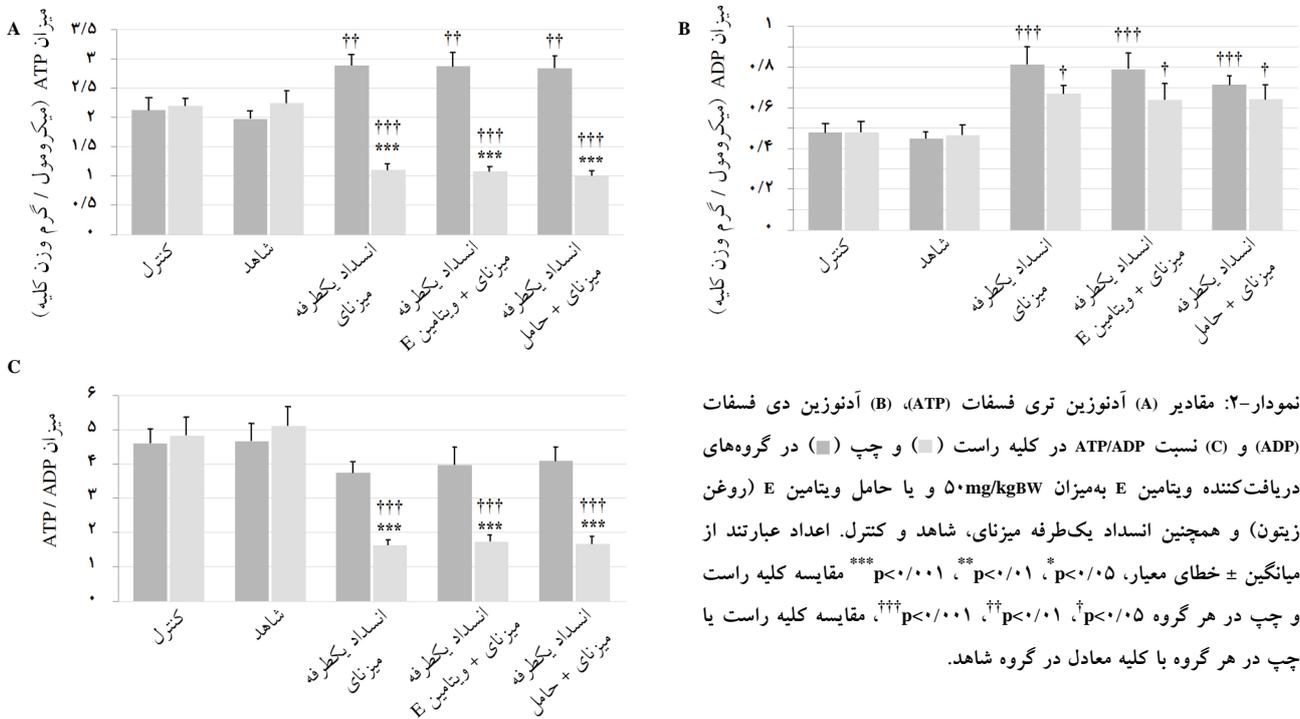
کلیه‌ها از جمله بافت‌هایی هستند که به‌خودی خود ROS را در طی متابولیسم اکسیداتیو تولید و به‌نوبه خود مستعد آسیب ناشی از اثرات آنها نیز هستند. چنانچه میزان تولید ROS به‌طور واضحی در کلیه افزایش یابد می‌تواند در شروع و یا توسعه آسیب‌های حاد کلیوی مشارکت داشته باشد.^۲ به‌طور کلی دامنه آسیب‌های ناشی از انسداد حاد یک طرفه میزنای بسیار وسیع بوده، به‌نحوی که 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 یک طرفه 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 سوپرا 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 احیاء کنندگی کل باشد.^{۱۱} در گروه UUO+NS مقدار FRAP

سرعت جایگاه خود را در بین محققین پیدا کرده است. این روش بر اساس توانایی مایعات بافتی در احیاء یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) در حضور ماده‌ای بنام TPTZ (Tripyridyl-S-Triazine) استوار است. میزان قدرت احیاءکنندگی مایعات بافتی از طریق افزایش میزان غلظت کمپلکس $TPTZ-Fe^{2+}$ 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 بافر استات، TPTZ و $FeCl_3.6H_2O$ تهیه شد و سپس $50 \mu L$ از بافت همگن به آن اضافه، و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی $37^\circ C$ قرار داده می‌شد. میزان جذب نوری ایجاد شده در $593 nm$ خوانده و با منحنی استاندارد حاصل از محلول $FeCl_3.6H_2O$ مقایسه و مقدار عددی برحسب $\mu mol/gKW$ 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 فسفاتتی و رساندن pH به حدود ۷/۵-۷، $10 \mu L$ 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 پیرووات و پیرووات 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 $\mu mol/gKW$ گزارش می‌شد. مقادیر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و متابولیسمی به‌صورت میانگین \pm خطای معیار (Mean \pm 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



نمودار-۱: مقادیر (A) مالوندی آلدئید (MDA) و (B) توانایی آنتی اکسیدانی / احیاء کنندگی آهن سه ظرفیتی (FRAP) در کلیه راست (■) و چپ (□) در گروه‌های دریافت کننده ویتامین E به میزان ۵۰mg/kgBW و یا حامل ویتامین E (روغن زیتون) و همچنین انسداد یک طرفه 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، ††p<۰/۰۱، †††p<۰/۰۰۱، 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 دریافت کننده ویتامین E به میزان ۵۰mg/kgBW و یا حامل ویتامین E (روغن زیتون) و همچنین انسداد یک طرفه میزنای، شاهد و کنترل. اعداد عبارتند از میانگین ± خطای معیار، *p<۰/۰۵، †p<۰/۰۱، ††p<۰/۰۰۱، †††p<۰/۰۰۱ مقایسه کلیه راست و چپ در هر گروه، †p<۰/۰۵، ††p<۰/۰۱، †††p<۰/۰۰۱، مقایسه کلیه راست یا چپ در هر گروه با کلیه معادل در گروه شاهد.

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

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

MDA = Malondialdehyde, FRAP = Ferric Reducing Antioxidant Power. مقایسه بین RK (کلیه راست) با LK (کلیه چپ) با یکدیگر در هر دوره. *p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱. 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. ###p<۰/۰۰۱، ##p<۰/۰۱، #p<۰/۰۵.

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

پارامترها	کنترل		شاهد		انسداد یک طرفه میزنای + نرمال سالیین		انسداد یک طرفه میزنای + ویتامین E		انسداد یک طرفه میزنای + روغن زیتون	
	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK
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	۱/۰۶±۰/۱۳	۱/۰۲±۰/۰۸	۲/۸۶±۰/۲۳	۱/۰۲±۰/۰۸
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	۰/۷۹±۰/۰۷	۰/۶۵±۰/۰۶	۰/۷۲±۰/۰۴	۰/۶۵±۰/۰۶
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	۱/۶۷±۰/۱۹	۴/۰۷±۰/۴۲	۱/۶۷±۰/۱۹

ATP = Adenosine Triphosphate, ADP = Adenosine Diphosphate. *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، ‡p<۰/۰۱، ††p<۰/۰۰۱، †††p<۰/۰۰۰۱ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) با گروه شاهد مربوطه در هر دوره. †††p<۰/۰۰۱، ††††p<۰/۰۰۰۱، †††††p<۰/۰۰۰۰۱ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) گروه UUU+VitE با سایر گروه‌های انسدادی.

برای تامین انرژی خود شدیداً به متابولیسم بی‌هوازی وابسته است.^{۱۵} محدودیت سرعت تولید ATP به وسیله میتوکندری در کلیه انسدادی به نوبه خود منجر به کاهش پتانسیل فسفریلاسیون اکسیداتیو و کاهش نسبت ATP/ADP خواهد شد که به خوبی با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (نمودار ۲C). از طرف دیگر افزایش سطح ATP در کلیه غیرانسدادی (نمودار ۲A) به احتمال زیاد ناشی از افزایش بار کاری جبرانی این کلیه به واسطه کم کاری کلیه انسدادی و لذا افزایش میزان متابولیسم اکسیداتیو در آن می‌باشد. همچنین افزایش میزان ADP در کلیه غیرانسدادی (نمودار ۲B) 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 ۲C) 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 یک طرف و افزایش مصرف آن (افزایش تشکیل ADP) از طرف دیگر روبروست. کاهش ظرفیت تولید ATP ممکن است ناشی از اختلالات به وجود آمده در جامعیت ساختاری و عملکردی میتوکندری به دنبال UUU باشد.^{۱۶} مطالعات انجام شده با کمک میکروسکوپ الکترونی در طی UUU حاد حکایت از هم گسیختگی در میتوکندری‌ها به همراه از دست دادن ظرفیت اکسیداتیو آنها می‌باشد.^۴ کلیه انسدادی در گروه UUU+OO همانند گروه UUU+NS، دارای افزایش ۳۷ درصد در میزان MDA (نمودار ۱A) و کاهش ۳۸ درصد در سطح FRAP (نمودار ۲A) نسبت به کلیه معادل گروه Sham-U بوده است. بنابراین، ۲۴ ساعت در گروه UUU+OO با همان مکانیزم‌هایی که در گروه

در کلیه غیرانسدادی طرف مقابل نیز نسبت به کلیه انسدادی و نیز نسبت به کلیه‌های گروه شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (نمودار ۱B)، 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.^۱ استرس اکسیداتیو افزایش یافته سبب تهی شدن منابع آنتی‌اکسیدان‌های سلولی نظیر گلوتاتیون و ویتامین E می‌گردد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که UUU حاد از طریق افزایش تولید ROS و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث بروز استرس اکسیداتیو در کلیه انسدادی شده است.^{۱۷} محققین عمده‌ترین دلایل افزایش تولید ROS در کلیه انسدادی را کاهش خون‌رسانی و افزایش فشار داخل توبولی ذکر می‌نمایند.^{۱۲} در حالی که کلیه غیرانسدادی که به واسطه فعالیت جبرانی و افزایش عملکردی احتمالاً 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.^{۱۳} در این مطالعه UUU حاد سبب کاهش شدید در تولید ATP (نمودار ۲A) به همراه افزایش در سطح ADP (نمودار ۲B) در کلیه انسدادی شد. کاهش در ATP ممکن است مربوط به تغییراتی در عملکرد غشاء میتوکندری، یا مهار فسفریلاسیون اکسیداتیو باشد.^{۱۴} نتایج مطالعات انجام شده به وسیله 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

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 UUU+OO و UUU+VitE هیچگونه تفاوتی را در هر دو کلیه نشان نمی‌دهد که حاکی از عدم اثر ویتامین E بر روی متابولیسم انرژی مختل شده توسط UUU حاد می‌باشد. به‌علاوه نکته قابل توجه آن است که استفاده از ویتامین E توانست استرس اکسیداتیو حاصل از UUU 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 تأثیری 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 میزنا 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

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 رادیکال‌های اکسیژن محیط آبی اطراف غشاء را گرفته و به‌صورت سینترزستیک 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 UUU در گروه UUU+VitE نسبت به گروه UUU+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 UUU ۲۴ ساعته توانسته است از بروز استرس اکسیداتیو به‌طور کامل در کلیه انسدادی جلوگیری نماید. در کلیه غیرانسدادی گروه UUU+OO، دقیقاً همانند گروه UUU+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 UUU+VitE، نه تنها مقادیر MDA کاهش و FRAP افزایش را نسبت به گروه UUU+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 UUU+OO، نقص متابولیسم انرژی ایجاد شده بر اثر ۲۴ ساعت UUU کاملاً شبیه به گروه UUU+NS بود. به‌طوری‌که در کلیه انسدادی نسبت

دانشگاه علوم پزشکی فارس که در حمایت مالی در اجرای این طرح ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را می‌نماییم.

استرس اکسیداتیو را بهبود بخشید و تاثیری در اختلال متابولیسمی نداشت. *سیاسگزار*: بدینوسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی

References

- 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.
- Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 2000; 109: 665-78.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nito H, Descoedres C, Kurokawa K, et al. Effect of unilateral obstruction on renal cell metabolism and function. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 60-71.
- Packer L. Interactions among antioxidants in health and disease: vitamin E and its redox cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992; 200: 271-6.
- Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 4-15.

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

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

Abstract

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

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 twice 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