Physiology and Pharmacology, 13 (3),253 -262
[Fall 2009] Article in Persian

Physiology and Pharmacology

Effects of liver ischemia-reperfusion on renal functional and oxidative stress indices

Saideh Mikaeili [1], Mehri Kadkhodaee [1*], Fereshteh Golab [1], Maryam Zahmatkesh [1], Mitra Mahdavi-Mazdeh [2], Behjat Seifi [1], Hossein-Ali Arab [3], Sedigheh Sham [4], Fahimeh Jafari [4]

1. Dept .Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Dept .Nephrology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept .Pharmacology, Faculty of Veterinary, Tehran University, Tehran,Iran
4. Children Medical Center, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 27 Apr 2009 **Accepted: 11 Oct 2009**

Abstract

Introduction: Liver ischemia/reperfusion (IR) is a major clinical problem, which occurs during several conditions such as liver damage, trauma and transplantation. Recent studies indicate that IR-induced acute liver failure causes injuries of distant organs such as heart and lungs by systematic inflammatory responses. Therefore, in the present study, effects of hepatic IR induction were studied on the kidneys.

Methods: Male rats were subjected to either sham operation or 90 min liver ischemia followed by 4 or 24 hrs of reperfusion. Liver IR injury was assessed by measurement of serum alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenases (LDH) levels. Blood Urea Nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) were determined as renal function indices. Renal malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase activities were also evaluated for assessment of oxidative stress.

Results: Ninety min liver ischemia followed by 4 hours of reperfusion caused a reduction in renal function demonstrated by an increase in BUN level. This was accompanied by an increase in renal MDA levels and a decrease in SOD and catalase activities. Liver reperfusion for 24 hours resulted in smaller damage to renal function and oxidative stress parameters.

Conclusion: This study suggests that liver IR causes renal damage reflected in functional abnormalities and oxidative stress. This damage is reduced by increasing the reperfusion time.

Keywords: Liver ischemia/reperfusion, oxidative stress, kidney.

*Corresponding author e -mail : kadkhodm@tums.ac.ir
Available online @ : www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۳)، ۲۵۳ – ۲۶۲
پاییز ۱۳۸۸

فیزیولوژی و فارماکولوژی

بررسی اثر ایسکمی– پرفیوژن مجدد کبد بر عملکرد و شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو کلیه

سعیده میکاییلی[۱]، مهری کدخدایی[۱*]، فرشته گلاب[۱]، مریم زحمتکش[۱]، میترا مهدوی مزده[۲]، بهجت سیفی[۱]، حسینعلی عرب[۳]، صدیقه شمس[۴]، فهیمه جعفری[۴]

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. بخش نفرولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. گروه فارماکولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
۴. مرکز طبی کودکان، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

دریافت: ۷ اردیبهشت ۸۸ پذیرش: ۱۹ مهر ۸۸

چکیده

مقدمه: ایسکمی– پرفیوژن مجدد (IR) کبد پدیده شایع کلینیکی است که در موارد متعددی از قبیل آسیب، تروما و پیوند کبد دیده می‌شود. بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد آسیب حاد کبدی ناشی از IR این عضو با ایجاد پاسخ‌های التهاب سیستمیک در نهایت می‌تواند موجب اختلال عملکرد ارگان‌های دوردست مانند قلب و ریه گردد. لذا در این تحقیق به بررسی تغییرات عملکردی و شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو کلیه بدنبال ایسکمی– پرفیوژن مجدد کبد پرداختیم.

روش‌ها: موش‌های صحرایی نر تحت عمل جراحی شم یا ۹۰ دقیقه ایسکمی کبد با ۴ یا ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. آسیب‌های ناشی از IR کبد بر عملکرد آن با اندازه‌گیری آلانین‌ترانس‌آمیناز، آسپارتات‌ترانس‌آمیناز، آلکالین‌فسفاتاز و لاکتات‌دهیدروژناز سرم و اثرات آن بر عملکرد کلیه‌ها با سنجش نیتروژن اوره خون و کراتینین سرم بررسی گردید. همچنین سطوح مالون‌دی‌آلدهاید و میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز بافت کلیه به عنوان شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو کلیوی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: ۹۰ دقیقه ایسکمی کبد– ۴ ساعت پرفیوژن مجدد موجب کاهش عملکرد کلیه‌ها گردید که با افزایش میزان نیتروژن اوره خون نشان داده شد. این تغییرات همچنین با افزایش سطوح مالون‌دی‌آلدهاید کلیه و کاهش فعالیت سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز همراه بود. ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد کبد موجب آسیب‌های کمتری در عملکرد و شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو کلیه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند ایسکمی– پرفیوژن مجدد کبد می‌تواند موجب ضایعات کلیه و استرس‌اکسیداتیو در این عضو گردد. این آسیب‌ها با افزایش زمان پرفیوژن مجدد کاهش می‌یابند.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی– پرفیوژن مجدد کبد، استرس اکسیداتیو، کلیه.

مقدمه

کبد ارگانی حیاتی است که در متابولیسم مواد در بدن، حذف بیلی‌روبین و اسیدهای صفراوی و دفع آنتی بیوتیک‌ها نقش عمده‌ای دارد. ایسکمی– پرفیوژن مجدد (Ischemia-reperfusion , IR) کبد پدیده شایعی است که در موارد متعددی از قبیل آسیب، تروما و پیوند کبد دیده می‌شود [۱۱]. در خلال ایسکمی– پرفیوژن مجدد کبد، در زمان ایسکمی، سلول‌های کوپفر فعال می‌شوند. سپس در زمان پرفیوژن مجدد این سلول‌های فعال

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: kadkhodm@tums.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

شده مقادیر فراوانی از گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species، ROS) را تولید می‌کنند. تجمع گونه‌های فعال اکسیژن موجب فعال شدن نوتروفیل‌ها و در نتیجه انفیلتراسیون آن‌ها به داخل بافت کبد می‌شود. نوتروفیل‌های انفیلتره شده با تولید فراوان ROS و چندین آنزیم پروتئاز مانند میلوپراکسیداز، الاستاز و کلاژناز موجب آسیب‌های شدید بافت کبد می‌گردند [۱۲].

IR کبدی می‌تواند منجر به کلستاز و اختلال عملکرد در اندام‌های دوردست گردد [۴]. آسیب حاد کبدی که در اثر IR کبد ایجاد می‌شود می‌تواند منجر به پاسخ‌های التهاب سیستمیک گردد که در نهایت موجب اختلال عملکرد ارگان‌های دوردست مانند قلب و ریه می‌شود [۷]. پاسخ التهابی ناشی از IR کبد در اثر تولید مقادیر فراوان سلول‌های التهابی و گونه‌های فراوان اکسیژن می‌باشد [۶]. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که بین آسیب‌های کلیوی و آسیب‌های ناشی از IR کبد ارتباطی وجود دارد [۲۴]. Messberg و همکاران معتقدند ضایعات ناشی از IR در اندام های دوردست یک نوع آسیب اکسیداتیو می‌باشد [۱۷]. مطالعات متعددی نشان می‌دهد که تولید گونه‌های فعال اکسیژن مدیاتورهای مهمی در آسیب‌های ناشی از IR می‌باشند [۱۵و ۲۸]. مالون‌دی‌آلدهاید (Malondialdehyde, MDA) محصول ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد که در اثر رادیکال‌های آزاد تولید می‌شود. آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز (Superoxide Dismutase, SOD) و کاتالاز (Catalase) به عنوان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که در سم زدایی آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن دخیل می‌باشند [۲۰]. افزایش مالون‌دی‌آلدهاید و کاهش فعالیت آنزیم کالاتاز و آنزیم سوپراکسید دسموتاز را می‌توان به عنوان شاخص‌های برهم خوردن تعادل بین مواد اکسیدان و آنتی‌اکسیدان و در نتیجه ایجاد استرس‌اکسیداتیو دانست [۱۴و ۲۲]. برخی از محققین اثرات آسیب رسانی ایسکمی- پرفیوژن مجدد را در ارگان‌های دوردست گزارش نموده اند، در حالیکه برخی دیگر اثری مشاهده نکرده‌اند. از آنجایی‌که در این زمینه نظرات متناقض وجود دارد، لذا در مطالعه کنونی بر آن شدیم تا تغییرات استرس اکسیداتیو کلیه را موازی با تغییرات آنزیم‌های کبدی بررسی کنیم. از آن جایی‌که پس از ۴ ساعت پرفیوژن مجدد تغییرات عملکرد کبدی (افزایش آنزیم‌های کبدی) به طور معنی‌داری مشاهده شد، تغییرات کلیوی هم در همین زمان بررسی شد. برای آگاهی از روند این تغییرات و یا برگشت پذیری احتمالی آن، زمان پرفیوژن مجدد ۲۴ ساعت نیز مورد مطالعه قرار گرفت. از این رو بررسی تغییرات پرفیوژن مجدد در دو بازه زمانی ۴ و ۲۴ ساعت و مقایسه آن می‌تواند گام موثری در فهم بهتر اثرات دور دست آسیب‌های ناشی از ایسکمی- پرفیوژن مجدد فراهم نماید.

مواد و روش‌ها

تعداد ۳۲ سر رت نر با محدوده وزنی ۳۰۰- ۲۵۰ گرم از نژاد Sprague-Dawley به طور تصادفی انتخاب شدند. رت‌ها در دمای استاندارد و در شرایط محیطی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و از نظر مصرف آب و غذا در تمام دوره آزمایش محدودیتی نداشتند. مسائل اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی نظیر بیهوشی در هنگام جراحی بر اساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران رعایت گردید تا حتی‌الامکان موجب درد و رنج حیوان نگردد. حیوانات با تزریق داخل صفاقی (۷۵mg/kg) پنتوباربیتال سدیم بیهوش شدند و با تزریق دوز نگهدارنده (۲۰ mg/kg) پنتوباربیتال سدیم بیهوشی ادامه یافت. نواحی جراحی (روی شکم) پس از برطرف کردن موها با پنبه و الکل تمیز شد. حیوانات در تمام مدت جراحی گرم نگهداشته شدند و جهت بررسی دما از ترمومتر رکتال استفاده شد.

یک برش طولی از زیر ناحیه جناغ به اندازه ۲ سانتی متر داده شد و پس از کنار زدن فاشیا و برش عضله رکتوس شکمی، کبد نمایان شد. بعد از نمایان شدن کبد، اتصالات بین کبد و دیافراگم صفاقی توسط قیچی جراحی جدا شد. سپس با فشار ملایم دو دست در طرفین ناحیه برش، کبد از حفره شکم خارج شد. در گروه‌های ایسکمی، شریان کبدی که خونرسانی لوب‌های چپ و میانی را بر عهده دارد توسط کلمپ بولداگ مسدود شد. کبد در تمام مدت ایسکمی توسط گاز استریل آغشته به نرمال‌سالین مرطوب نگهداشته شد و کلیه مراقبت‌های لازم برای جلوگیری از دهیدراتاسیون حیوان انجام شد. پس از طی زمان ایسکمی کلمپ به آهستگی برداشته شده و کبد به داخل حفره شکم منتقل شد. سپس محل برش جراحی توسط نخ سیلک ۳ صفر دوخته شده و حیوانات به قفس‌های مجزا انتقال

داده شدند.

این حیوانات به طور تصادفی در چهار گروه ۸ تایی تقسیم‌بندی شدند. گروه‌ها به قرار زیر بودند:

۱- ایسکمی ۹۰ دقیقه - پرفیوژن مجدد ۴ ساعت (IR ۴ ساعته)

۲- شم ایسکمی ۹۰ دقیقه - پرفیوژن مجدد ۴ ساعت (شم ۴ ساعته)

۳- ایسکمی ۹۰ دقیقه - پرفیوژن مجدد ۲۴ ساعت (IR ۲۴ ساعته)

۴- شم ایسکمی ۹۰ دقیقه - پرفیوژن مجدد ۲۴ ساعت (شم ۲۴ ساعته)

گروه‌های شم جراحی تحت همه مراحل فرایند جراحی بدون انسداد عروق قرار گرفتند. در انتهای مرحله پرفیوژن مجدد پس از خونگیری، بافت کلیه جهت بررسی شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو در فریزر ۸۰- نگهداری شد. خونگیری از آئورت شکمی انجام شده و نمونه خون جهت تهیه سرم در سانتریفوژ (۳۰۰۰دور، ۱۵دقیقه، ۴-۰ درجه سانتی‌گراد، ساخت شرکت سوفر آمریکا) قرار داده شد.

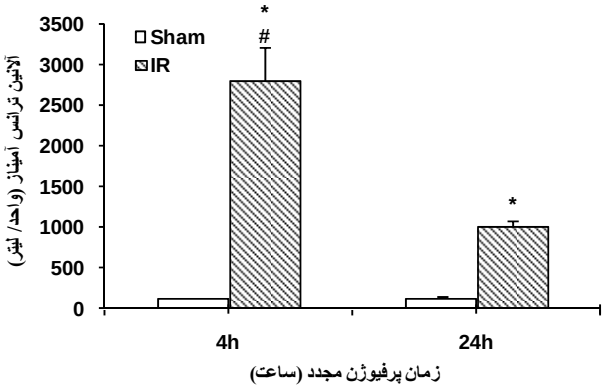
آلانین‌ترانس‌آمیناز (Alanine transaminase, ALT)، آسپارتات‌ترانس‌آمیناز (Aspartate transaminase, AST)، آلکالین‌فسفاتاز (Alkaline phosphatase, ALK) و لاکتات‌دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase, LDH) به عنوان آنزیم‌های عملکرد کبدی و نیتروژن اوره خون (BUN) و کراتینین (Creatinine, Cr) سرم به عنوان شاخص‌های عملکرد کلیوی با دستگاه اتوآنالیزر هیتاچی ۷۰۴ (ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد. برای تعیین وضعیت استرس‌اکسیداتیو بافت کلیه از اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهاید، سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز استفاده گردید. میزان مالون‌دی‌آلدهاید بافت کلیه با استفاده از متد Esterbauer و Cheeseman سنجیده شد. اساس این روش بر مبنای اندازه‌گیری مواد واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید می‌باشد [۹]. به طور خلاصه ۵۰ میلی‌گرم از بافت کلیه با ۱ میلی‌لیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) جهت ته نشین شدن و رسوب پروتئین‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. بعد از آن ۵۰۰ میکرولیتر از بخش فوقانی سوپ حاصله برداشته شده و به آن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۶۷٪ (۳۳ میلی گرم TBA در ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه، تهیه شده از شرکت سیگما- آلدریچ آلمان) اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام جوش (Memmert ,USA) قرار داده شد. پس از سرد شدن جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتری (Shimadzu, Japan) خوانده شد و پس از مقایسه با منحنی استاندارد غلظت آن‌ها محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز طبق روش Paoletti و Mocali صورت گرفت [۲۱]. در این روش ۵۰ میلی‌گرم از بافت کلیه را با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات هموژن کرده، به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ با دور۴۲۰۰ قرار داده، سپس ۴۰۰ میکرولیتر از سوپ بافت را برداشته و به همراه ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات داخل کیسه دیالیز قرار داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر فیلترا (محلول حاصل ازکیسه دیالیز)، ۸۰۰ میکرولیتر محلول TDB، ۴۰ میکرولیتر محلول NADPH (شرکت مرک آلمان) و ۲۵ میکرولیتر از محلول EDTA-MnCl2 در داخل کووت ریخته شد، سپس در دقیقه پنجم ۱۰۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول (شرکت بیوژن ایران) اضافه و میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر در دقیقه‌های ۱۲و۲۰ ثبت گردید.

جهت اندازه‌گیری کاتالاز، طبق متد Aebi تجزیه H2O2 با کاهش در جذب نوری در محدوده ماورا بنفش همراه است [1]. با استفاده از این خاصیت، کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر ماورابنفش (UV-3100, Shimadzu, Japan) اندازه‌گیری و اختلاف جذب در واحد زمان (۳۰ ثانیه) به عنوان اساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده گردید. بطور خلاصه ۵۰ میلی‌گرم بافت کلیه را با ۴۵۰ میکرولیتر بافر ایزوتونیک و ۵۰ میکرولیتر تریتون ۱٪ هموژن کرده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ با دور ۴۲۰۰ قرار داده شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع فوقانی سانتریفوژ شده را برداشته و با ۲۵ میلی‌لیتر بافر فسفات به میزان ۵۰۰ بار رقیق گردید. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصله را داخل کووت ریخته و ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (شرکت Wako ژاپن) ۳۰ میلی مولار را به آن اضافه کرده و در مقابل بلانک در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه مانیتور شد.

فعالیت آنزیم بر اساس رابطه زیر محاسبه شد.

$$K= (2.3/30)\ (\log A1/A2)\ a$$



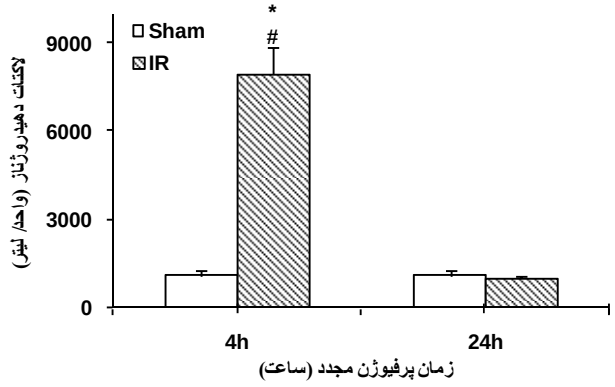
شکل۱- تغییرات غلظت آلانین ترانس آمیناز سرم در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار میزان آلانین ترانس آمیناز سرم می‌باشد. *: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد. #: اختلاف معنی‌دار را نسبت به بقیه گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

که در این فرمول ۲/۳ عدد ثابت، ۳۰ فاصله زمانی مانیتورینگ، A1 جذب در زمان صفر، A2 جذب در زمان ۳۰ ثانیه و a فاکتور رقت می‌باشد که ۵۰۰ است. اطلاعات بصورت میانگین ± خطای معیار بیان شد. برای مقایسه بین گروه‌ها از تست ANOVA یکطرفه و Tukey post test استفاده شد.

یافته‌ها

میزان آنزیم‌های کبدی (آلانین‌ترانس‌آمیناز و آسپارتات ترانس‌آمیناز) در گروه‌های ایسکمی ۹۰ دقیقه – پرفیوژن مجدد ۴ و ۲۴ ساعت نسبت به گروه‌های شم مربوطه با p<۰/۰۵

شکل۲- تغییرات غلظت آسپارتات ترانس آمیناز سرم در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار میزان آسپارتات ترانس آمیناز سرم می‌باشد. *: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد. #: اختلاف معنی‌دار را نسبت به بقیه گروه‌ها ساعت در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد.



شکل۳- تغییرات غلظت لاکتات دهیدروژناز سرم در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار میزان لاکتات دهیدروژناز سرم می‌باشد. *: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد. #: اختلاف معنی‌دار را نسبت به بقیه گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

افزایش معنی‌داری را نشان داد. میزان این آنزیم‌ها در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه IR ۴ ساعته با p<۰/۰۵ کمتر بود. علی‌رغم کاهش سطح آنزیم‌ها در این گروه همچنان اختلاف معنی‌داری با گروه‌های شم مربوطه را نشان می‌داد (شکل ۱ و ۲).

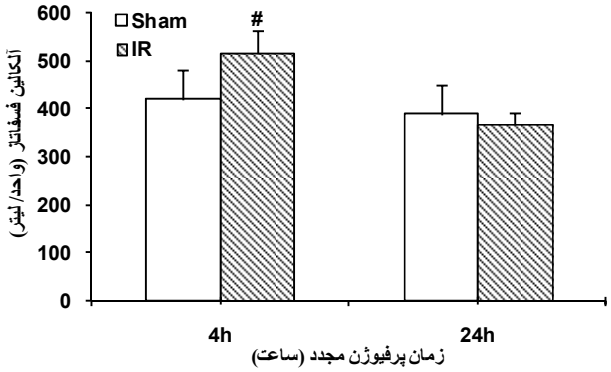
میزان لاکتات دهیدروژناز در گروه ایسکمی ۹۰ دقیقه – پرفیوژن مجدد ۴ ساعت نسبت به گروه شم مربوطه با p<۰/۰۵ افزایش معنی‌داری نشان داد. میزان این آنزیم در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه IR ۴ ساعته با p<۰/۰۵ کمتر بود (شکل ۳).

میزان آلکالین‌فسفاتاز در گروه ایسکمی ۹۰ دقیقه – پرفیوژن مجدد ۴ ساعت نسبت به شم مربوطه با p<۰/۰۵ افزایش معنی‌داری را نشان داد. میزان این آنزیم در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به شم مربوطه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. البته سطح این آنزیم در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه IR ۴ ساعته با p<۰/۰۵ کاهش یافت (شکل ۴).

میزان نیتروژن اوره خون در گروه ایسکمی ۹۰ دقیقه – پرفیوژن مجدد ۴ ساعت بطور معنی‌داری (p<۰/۰۵) نسبت به گروه شم ۴ ساعته افزایش یافت. کاهش معنی‌داری در میزان نیتروژن اوره خون گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه IR ۴ ساعته مشاهده شد.

به گونه‌ای که میزان نیتروژن اوره خون در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه شم مربوطه اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۵).

میزان کراتینین در گروه‌های ایسکمی ۹۰ دقیقه – پرفیوژن



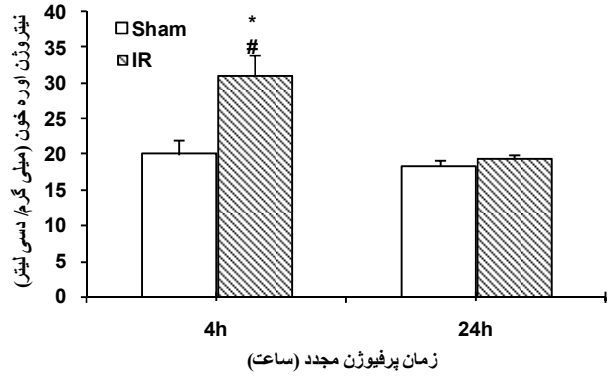
شکل۴- تغییرات غلظت آلکالین فسفاتاز سرم درگروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار میزان آلکالین فسفاتاز سرم می‌باشد. #: اختلاف معنی‌دار را نسبت به بقیه گروه‌ها در سطح $p< ۰/۰۵$ نشان می‌دهد.

مجدد ۴ و ۲۴ ساعت نسبت به گروه‌های شم مربوطه‌شان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۶).

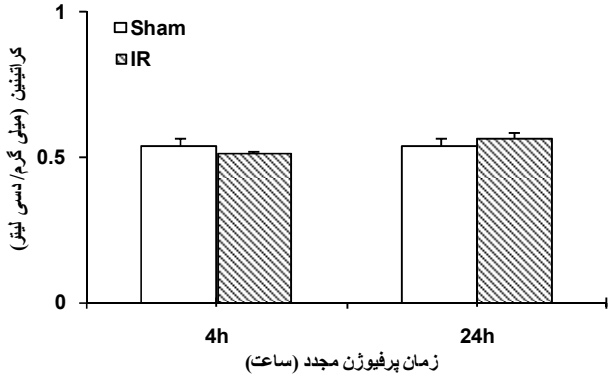
میزان مالون‌دی‌آلدهاید در گروه ایسکمی ۹۰ دقیقه – پرفیوژن مجدد ۴ ساعت نسبت به گروه شم مربوطه با $p<۰/۰۵$ افزایش معنی‌داری را نشان داد. میزان مالون‌دی‌آلدهاید در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه IR ۴ ساعته با $p<۰/۰۵$ کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۷).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در گروه ایسکمی ۹۰ دقیقه – پرفیوژن مجدد ۴ ساعت نسبت به گروه شم مربوطه با $p<۰/۰۵$ کاهش معنی‌داری را نشان داد. فعالیت این آنزیم در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه IR ۴ ساعته افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۸).

فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه ایسکمی ۹۰ دقیقه –



شکل۵- تغییرات غلظت نیتروژن اوره خون در سرم گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار غلظت نیتروژن اوره خون در سرم می‌باشد. *: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح $p<۰/۰۵$ نشان می‌دهد. #: اختلاف معنی‌دار را نسبت به بقیه گروه‌ها در سطح $p<۰/۰۵$ نشان می‌دهد.



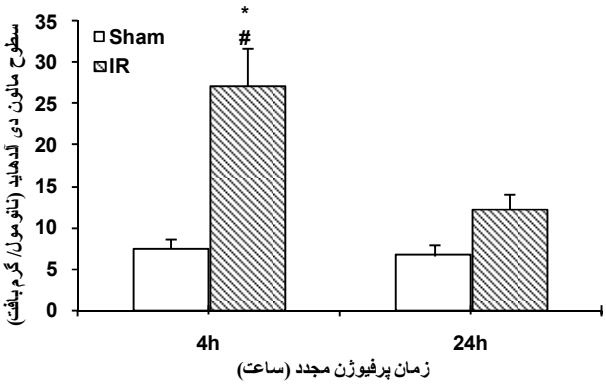
شکل۶- تغییرات غلظت کراتینین سرم در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار غلظت کراتینین سرم می‌باشد.

پرفیوژن مجدد ۴ ساعت نسبت به گروه شم مربوطه با $p<۰/۰۵$ کاهش معنی‌داری را نشان داد. فعالیت این آنزیم در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه شم خود تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۹).

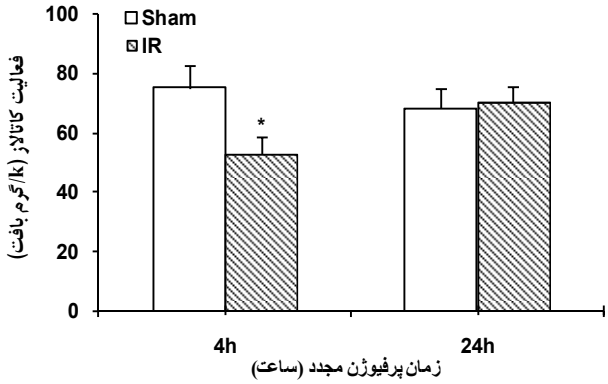
بحث

ایسکمی – پرفیوژن مجدد کبد یکی از دلایل اصلی ایجاد نارسایی حاد کبدی می‌باشد. این عارضه در بسیاری موارد با نارسایی حاد کلیوی همراه می‌باشد [۱۰]. به همین دلیل در این مطالعه بر آن شدیم با ایجاد ایسکمی کبد به تغییرات حاصله در کلیه به عنوان یک ارگان دوردست بپردازیم و برای بررسی وضعیت ایسکمی کبد به اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی (ALT, AST, LDH, ALK) پرداختیم.

سطوح آلانین ترانس آمیناز و آسپارتات ترانس آمیناز به عنوان اندکس‌های حساس آسیب حاد کبدی در نظر گرفته می‌شود [۱۶]. Tanaka و همکاران حداکثر میزان آنزیم آلانین ترانس آمیناز را در ۶ ساعت پرفیوژن مجدد بدنبال ایسکمی پارشیال کبد مشاهده کردند و سطح این آنزیم بعد از ۶ ساعت کاهش یافت [۲۵]. Yabe و همکاران نشان دادند که میزان آنزیم‌های کبدی (آلانین ترانس آمیناز و آسپارتات ترانس آمیناز) بدنبال ایسکمی کبد و شروع پرفیوژن مجدد افزایش یافته و این آنزیم‌ها در ۶ ساعت به ماکزیمم مقدار خود رسیدند. آن‌ها پیشنهاد کردند که عمده آسیب‌ها در مرحله پرفیوژن مجدد صورت می‌گیرد [۲۷]. در همین راستا مطالعه ما نیز نشان داد که



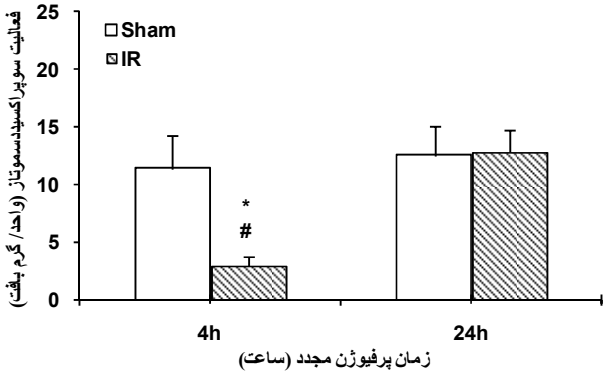
شکل۷- تغییرات غلظت مالون دی آلدهاید بافت کلیه در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار غلظت مالون دی‌آلدهاید می‌باشد. *: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد. #: اختلاف معنی‌دار را نسبت به بقیه گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد.



شکل۹- تغییرات سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت کلیه در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد. *: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

۹۰ دقیقه ایسکمی کبد با پرفیوژن مجدد ۴ ساعت موجب افزایش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی (آلانین ترانس آمیناز و آسپارتات ترانس آمیناز) نسبت به گروه شم گردید. سطوح این آنزیم‌ها در گروه IR ۲۴ ساعته نسبت به گروه IR ۴ ساعته کاهش معنی‌داری یافت که این امر می‌تواند نشاندهنده حداکثر آسیب ایجاد شده طی ۴ ساعت پرفیوژن مجدد باشد. علی‌رغم کاهش سطوح آنزیم‌ها، تفاوت معنی‌داری بین گروه IR ۲۴ ساعته با شم مربوطه مشاهده شد که نشانگر اختلال پابرجای کبدی با گذشت ۲۴ ساعت از زمان پرفیوژن مجدد می‌باشد.

لاکتات دهیدروژناز به عنوان یکی از آنزیم‌های اختلال عملکرد کبد می‌باشد که افزایش سطح این آنزیم در پلاسما



شکل۸- تغییرات فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز بافت کلیه در گروه‌های مختلف. هر یک از ستون‌ها نمایانگر میانگین ± خطای معیار فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز می‌باشد. *: اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه Sham مربوطه در سطح p<0.05 نشان می‌دهد. #: اختلاف معنی‌دار را نسبت به بقیه گروه‌ها در سطح p<۰/۰۵ نشان می‌دهد.

بدنبال IR کبد گزارش شده است. طی پژوهشی که توسط Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت افزایش آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز بدنبال ایسکمی پارشیال کبد گزارش شد. مشاهدات آن‌ها نشان داد که سطح این آنزیم در نیم ساعت پرفیوژن مجدد به پیک خود رسیده و سپس مقادیر آنزیم کاهش یافت. همچنین آن‌ها کاهش معنی‌داری بین سطوح این آنزیم در ۲۴ ساعت نسبت به ۶ ساعت را گزارش دادند [۲۸].

در همین راستا، مطالعه ما نیز نشان داد که میزان آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در گروه ایسکمی ۹۰ دقیقه با پرفیوژن مجدد ۴ ساعت نسبت به گروه شم مربوطه افزایش معنی‌داری یافت و سطح آنزیم‌ها با گذشت زمان رو به کاهش نهاد، به طوری که میزان آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز و آلکالین فسفاتاز در گروه IR 24 ساعته نسبت به شم مربوطه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

نیتروژن اوره خون و کراتینین پلاسما به عنوان شاخص‌های عملکرد کلیه در نظر گرفته می‌شوند و افزایش غلظت آن‌ها نشان‌دهنده آسیب عملکردی کلیه می‌باشد [۲]. از این رو بر آن شدیم با اندازه‌گیری نیتروژن اوره خون و کراتینین سرم به بررسی وضعیت عملکرد کلیه به عنوان یک ارگان دوردست بدنبال IR کبدی بپردازیم. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۹۰ دقیقه ایسکمی کبد موجب افزایش میزان BUN سرم گردید که این امر نشاندهنده کاهش پرفیوژن کلیه‌ها است. مطالعه Wanner و همکاران نیز نشان داد که IR کبدی غلظت کراتینین پلاسما را افزایش می‌دهد. بدین ترتیب آن‌ها پیشنهاد

کردند ایسکمی- پرفیوژن مجدد کبد موجب اختلال عملکرد کلیه به عنوان یک اندام دور می‌گردد [۲۶]. در مقابل مطالعه Behrend و همکاران تنها تغییرات خفیفی را در غلظت اوره سرم بدنبال IR کبد نشان داد و آن‌ها بر این باورند که آسیب حاد کبدی ناشی از IR تنها موجب یک اختلال عملکرد موقت در کلیه‌ها می‌گردد [۵].

مطالعه حاضر نشان داد که ایسکمی- پرفیوژن مجدد کبد می‌تواند منجر به تغییراتی در شاخص‌های استرس اکسیداتیو کلیه به عنوان یک ارگان دوردست گردد. رابطه مستقیمی بین استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا وجود دارد و مالون‌دی آلدهاید به عنوان شاخص مناسبی از میزان پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد [۲۳]. مطالعه Esme و همکاران نشان داد که ایسکمی- پرفیوژن مجدد ریه منجر به تغییراتی در شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو از جمله مالون‌دی آلدهاید در ارگان‌های دور می‌گردد. [۸]. همچنین Mutlu و همکاران بیان کردند که ایسکمی- پرفیوژن مجدد روده موجب پراکسیداسیون لیپیدهای کلیه و در نتیجه افزایش غلظت مالون‌دی آلدهاید کلیه گشت [۱۹]. نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که میزان مالون‌دی آلدهاید در گروه پرفیوژن مجدد ۴ ساعت نسبت به گروه شم افزایش معنی‌داری یافت که این امر تاییدی بر ایجاد استرس اکسیداتیو و در نتیجه پراکسیداسیون لیپیدهای کلیه در اثر IR کبد می‌باشد. سپس میزان این شاخص رو به کاهش نهاد بطوریکه میزان این شاخص در گروه پرفیوژن مجدد ۲۴ ساعته کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه پرفیوژن مجدد ۴ ساعته نشان داد. مشابه با نتایج این تحقیق مطالعه دیگری در سال ۲۰۰۹ نشان داد که میزان پراکسیداسیون لیپیدها (MDA) بدنبال ایسکمی پارشیال خود عضو (کبد) افزایش نشان داده به طوری که در ۳ ساعت پرفیوژن مجدد به حداکثر مقدار خود رسید. سپس میزان این شاخص رو به کاهش نهاده و این کاهش تا ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد همچنان ادامه داشت. این نتایج نشانگر آسیب شدیدتر ایجاد شده در ۳ ساعت پرفیوژن مجدد می‌باشد [13]. عدم تعادل بین تولید ROS و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها می‌تواند منجر به آسیب‌هایی در طی پرفیوژن مجدد گردد. کم بودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، بافت را در برابر اثرات ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد آسیب‌پذیر می‌کند [۱۸]. برخی مطالعات اثر محافظتی آنتی‌اکسیدان‌ها را در کاهش اختلال عملکرد ذکر کرده‌اند [۲۷]. Aktoz و همکاران نشان دادند که ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیه موجب کاهش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز) عضو می‌گردد [۲]. همچنین مطالعه Atahan و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که ایسکمی پرفیوژن مجدد عضله اسکلتی موجب کاهش سطح آنزیم سوپراکسید دسموتاز در این عضو می‌شود [۳]. مطالعه Jiang و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز بافت کبد در ۳ ساعت پرفیوژن مجدد بدنبال ۶۰ دقیقه ایسکمی پارشیال کبد به حداقل مقدار خود رسیده و بعد از این زمان شروع به افزایش یافته و این افزایش تا ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد همچنان ادامه داشت [۱۳].

مطالعه حاضر نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز را در گروه IR 4 ساعته نسبت به شم مربوطه نشان داد. البته میزان این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با گذشت زمان رو به افزایش نهاد بطوریکه سطح آنهادر گروه IR 24 ساعته نسبت به گروه شم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. کاهش شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت کلیه در گروهIR 24 ساعته نسبت به گروهIR ۴ ساعته نشاندهنده بهبود وضعیت اکسیداتیو بافت کلیه می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصل، ایسکمی- پرفیوژن مجدد کبد موجب استرس اکسیداتیو کلیه و در نتیجه تغییر عملکرد این عضو به عنوان یک ارگان دوردست می‌گردد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی با استفاده از آنتی اکسیدان‌های مناسب با عوارض ناشی از استرس اکسیداتیو مقابله گردد. همچنین در شرایطی مانند جراحی‌های سیستمیک، شوک گردش خون و یا حتی پیوند اعضا که ایسکمی پرفیوژن مجدد کبدی محتمل می‌باشد، ضایعات ناشی از ایسکمی بر ارگان‌های دوردست بویژه کلیه مد نظر قرار گیرد.

سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات پیوند دانشگاه علوم پزشکی تهران که با حمایت‌های مالی خود ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند قدردانی می‌شود.

References

[1] Aebi H, Catalase in vitro. ***Methods Enzymol*** 105 (1984) 121-126.

[2] Aktoz T, Aydogdu N, Alagol B, Yalcin O, Huseyinova G, Atakan IH, The protective effects of melatonin and vitamin E against renal ischemia-reperfusion injury in rats. ***Ren Fail*** 29 (2007) 535-542.

[3] Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U, Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. ***J Surg Res*** 137 (2007) 109-116.

[4] Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Renal protection by brief liver ischemia in rats. ***Transplantation*** 74 (2002) 1247-1251.

[5] Behrends M, Hirose R, Park YH, Tan V, Dang K, Xu F, Remote renal injury following partial hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. ***J Gastrointest Surg*** 12 (2008) 490-495.

[6] Chen CF, Wang D, Hwang CP, Liu HW, Wei J, Lee RP, The protective effect of niacinamide on ischemia-reperfusion-induced liver injury. ***J Biomed Sci*** 8 (2001) 446-452.

[7] Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. ***Transplantation*** 49 (1990) 268-272.

[8] Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O, Effect of lung ischemia--reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. ***Eur J Cardiothorac Surg*** 29 (2006) 294-298.

[9] Esterbauer H, Cheeseman KH, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. ***Methods Enzymol*** 186 (1990) 407-421.

[10] Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. ***Exp Mol Pathol*** 74 (2003) 86-93.

[11] Hasselgren PO, Prevention and treatment of ischemia of the liver. ***Surg Gynecol Obstet*** 164 (1987) 187-196.

[12] Jaeschke H, Farhood A, Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. ***Am J Physiol*** 260 (1991) 355-362.

[13] Jiang WW, Kong LB, Li GQ, Wang XH, Expression of iNOS in early injury in a rat model of small-for-size liver transplantation. ***Hepatobiliary Pancreat Dis Int*** 8 (2009) 146-151.

[14] Kiris I, Okutan H, Savas C, Yonden Z, Delibas N, Gadolinium chloride attenuates aortic occlusion-reperfusion-induced myocardial injury in rats. ***Saudi Med J*** 28 (2007) 347-352.

[15] Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW, Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. ***Transplant Proc*** 37 (2005) 1653-1656.

[16] Li JY, Gu X, Yin HZ, Zhou Y, Zhang WH, Qin YM, Protective effect of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury by advancing the expressive phase of survivin in rats. ***Hepatobiliary Pancreat Dis Int*** 7 (2008) 615-620.

[17] Massberg S, Messmer K, Superoxide anion as a marker of ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. ***Transplant Proc*** 38 (2006) 46-48.

[18] Masztalerz M, Wlodarczyk Z, Czuczejko J, Slupski M, Kedziora J, Superoxide anion as a marker of ischemia-reperfusion injury of the transplanted kidney. ***Transplant Proc*** 38 (2006) 46-48.

[19] Mutlu G, Abbasoglu L, Dogru-Abbasoglu S, Solakoglu S, Bulut M, Morphologic changes and lipid peroxidation in renal tissues of young rats following intestinal ischemia-reperfusion. ***Pediatr Surg Int*** 18 (2002) 337-340.

[20] Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF, Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. ***J Clin Invest*** 74 (1984) 1156-1164.

[21] Paoletti F, Mocali A, Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. ***Methods Enzymol*** 186 (1990) 209-220.

[22] Polat C, Tokyol C, Kahraman A, Sabuncuoglu B, Yilmaz S, The effects of desferrioxamine and quercetin on hepatic ischemia-reperfusion induced renal disturbance. ***Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*** 74 (2006) 379-383.

[23] Spitz DR, Oberley LW, An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. ***Anal Biochem*** 179 (1989) 8-18.

[24] Suzuki S, Serizawa A, Sakaguchi T ،Tsuchiya Y, Kojima Y, Okamoto K, The roles of platelet-activating factor and endothelin-1 in renal damage after total hepatic ischemia and reperfusion. ***Transplantation*** 69 (2000) 2267-2273.

[25] Tanaka Y, Chen C, Maher JM, Klaassen CD, Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression

in rat hepatic ischemia-reperfusion. ***Transplantation*** 82 (2006) 258-266.

[26] Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. ***Shock*** 5 (1996) 34-340.

[27] Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. ***J Pharmacol Exp Ther*** 298(2001) 894-899.

[28] Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J, Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia–reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. ***Transplant Proc*** 39 (2007) 1332-1337.