Physiology and Pharmacology, 12 (2), 149 - 157
Summer 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The effect of short ischemic periods in reducing subsequent rat renal ischemic injury

Hassan Mohammadhosseniakbari[1,2], Bahram Rasoulian[3*], Mahmood Mofid[4], Ali Noroozzadeh[5], Majid Noroozi[6], Farnaz Behrahi, Mahbube Jabari, Nassim Moradi Rad, Mahvash Jafari[6], Yaghoob Shirkhani[7], Ali Khoshbaten[8]

1. Dept. Pathology, 2. Trauma Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran
4. Dept. Anatomy, 5. Dept. Physiology and Biophysics, 6. Dept. Biochemistry, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran
7. Dept. Laboratory Sciences, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran
8. Research Center for Chemical Injuries, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 20 Aug 2007 Revised: 22 Mar 2008 Accepted: 11 June 2008

Abstract

Introduction: Using brief episodes of ischemia and reperfusion (IR) prior to a more sustained IR insult, i.e., ischemic preconditioning (IPC), can reduce IR injury of the heart, brain and many other tissues. The purpose of the present study was to investigate the effect of 2 min ischemic periods on subsequent rat renal IR injury.

Methods: Renal IR injury was investigated in a right nephrectomized model in male rats. For this purpose, plasma creatinine (Cr) and urea, creatinine clearance, fractional excretion of sodium and histological injury score (Jablonski score; 0-4) were compared among the following groups; IR group (40min of renal ischemia followed by 24 h reperfusion), sham group (no IR) and IPC group (3 times of “2 min ischemia–5min reperfusion” before 40 min of renal ischemia followed by 24h reperfusion).

Results: Necrosis score was significantly lower in the IPC compared with the IR group. Furthermore, rats with a Jablonski score of 4 were significantly less frequent in the IPC group compared to the IR group (11.1% vs. 75%). Plasma Cr and urea, creatinine clearance and fractional excretion of sodium were not significantly different between the IPC and IR groups. Rats with plasma urea levels higher than 190 mg/dl and also rats with fractional excretion of sodium beyond 2% were significantly less frequent in the IPC group compared to the IR group. Also Fractional excretion of sodium was not significantly different between IPC and sham groups.

Conclusion: Using 3 times of "2 min ischemia–5 min reperfusion" before the injurious ischemic insult can reduce rat renal histological injury and partially attenuate functional renal injury.

Keywords: Kidney; Ischemia; Preconditioning; Reperfusion

* Corresponding author e- mail: bahramrasoulian@gmail.com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۲)، ۱۴۹ – ۱۵۷
تابستان ۱۳۸۷

اثر دوره‌های کوتاه‌مدت ایسکمی بر کاهش آسیب ایسکمیک بعدی در کلیه موش صحرایی

حسن‌محمد حسینی‌اکبری[۱،۲]، بهرام رسولیان[۳*]، محمود مفید[۴]، علی نوروززاده[۵]، مجید نوروزی[۶]، فرناز بهرهی[۶]، محبوبه جباری[۶]، نسیم مرادی‌راد[۶]، مهوش جعفری[۶]، یعقوب شیرخانی[۷]، علی خوش‌باطن[۸]

۱- مرکز تحقیقات تروما، ۲- گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

۳- مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی،دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد ۴- گروه آناتومی، ۵- گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، ۶- گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران۷- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد

۸- مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

دریافت: مرداد ۸۶ بازبینی: فروردین ۸۷ پذیرش: خرداد ۸۷

چکیده

مقدمه: اعمال دوره‌های کوتاه مدت ایسکمی–خونرسانی مجدد (IR) قبل از یک واقعه IR جدی‌تر که به آن ischemic preconditioning (IPC) گفته می‌شود؛ می‌تواند از شدت آسیب IR قلب، مغز و بسیاری از بافتهای دیگر بکاهد. هدف از تحقیق فعلی بررسی تأثیر دوره‌های ۲ دقیقه‌یی ایسکمی گذرا بر آسیب IR کلیوی بعدی در موش صحرایی بود.

روش‌ها: آسیب IR کلیوی موشهای صحرایی نر که کلیه راست آنها خارج شده بود مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور شاخصهای کراتینین (Cr) و اوره پلاسما، کلیرانس کراتینین، کسر دفع سدیم و اسکور آسیب بافتی (اسکور جابلونسکی؛ ۴–۰) در گروههای ذیل مورد مقایسه قرار گرفتند: گروه IR (۴۰ دقیقه ایسکمی کلیوی –۲۴ ساعت خونرسانی مجدد)، گروه شم (عدم IR)، و گروه IPC (اعمال سه دوره ۲ دقیقه ایسکمی – ۵ دقیقه خونرسانی مجدد قبل از اعمال ۴۰ دقیقه ایسکمی کلیوی –۲۴ ساعت خونرسانی مجدد).

یافته‌ها: درجه نکروز بافتی در گروه IPC بطور معنی‌داری کمتر از گروه IR بود و موارد با درجه آسیب برابر ۴ در گروه IPC به مراتب فراوانی کمتری از گروه IR داشتند (۱۱/۱ درصد در برابر ۷۵ درصد). بین مقادیر کراتینین و اوره پلاسما، کلیرانس کراتینین و کسر دفع سدیم در گروه IR و گروه IPC تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. موارد با اوره بالاتر از ۱۹۰ mg/dl و نیز موارد با کسر دفع سدیم بیشتر از ۲٪ به طور معنی‌داری در گروه IPC فراوانی کمتری از گروه IR داشتند. همچنین از نظر کسر دفع سدیم تفاوت بین گروه IPC و شم معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: اعمال سه دوره"۲ دقیقه ایسکمی–۵ دقیقه خونرسانی مجدد" قبل از واقعه ایسکمی آسیب‌رسان می‌تواند از شدت آسیب بافتی کلیه بکاهد و بطور نسبی آسیب عملکردی کلیه را هم کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: کلیه؛ ایسکمی؛ حالت آماده‌باش؛ خونرسانی مجدد

مقدمه

نارسایی حاد کلیوی (ARF) که با از دست دادن سریع توانایی کلیه‌ها برای دفع مواد زاید، تغلیظ ادرار، نگه‌داری الکترولیت‌ها و حفظ تعادل مایعات مشخص شود، مشکل بالینی شایعی خصوصاً در بخش‌های مراقبت ویژه است که با مرگ‌ومیر حدود ۵۰٪ تا۸۰٪ همراه می‌باشد [۲۴]. شیوع ARF بویژه در افراد سالمند در حال افزایش است و میزان بروز آن بطور متوسط ۵۰۰ مورد در هر

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: bahramrasoulian@gmail.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

یک میلیون نفر در سال تخمین زده شده است و آن‌دسته از موارد ARF که نیاز به دیالیز پیدا می‌کنند را ۲۰۰ مورد در هر یک میلیون نفر در سال گزارش کرده‌اند. از جمله مهمترین علل ARF سپسیس، افت فشار خون، داروهای دارای سمیت کلیوی و مواد حاجب رادیوگرافی هستند [۷]. علل ARF به سه گروه پیش‌کلیوی، داخل‌کلیوی و پس‌کلیوی تقسیم می‌شوند و شایع‌ترین علل داخل‌کلیوی نارسایی حاد کلیه علل ایسکمیک می‌باشند [۲۶]. در صورتی که ایسکمی طول بکشد نهایتا منجر به نکروز سلولی خواهد شد؛ از سوی دیگر برقراری مجدد خونرسانی به بافت ایسکمیک که برای حفظ حیات آن الزامی است خود می‌تواند باعث شدیدتر شدن آسیب ناشی از ایسکمی شود. بطوریکه سهم عمده‌ای از آسیب ایسکمی- خونرسانی مجدد (Ischemia-Reperfusion = IR) در بافت‌های مختلف به آسیب ناشی از خونرسانی مجدد مربوط می‌شود. آسیب IR کلیه در شرایط مختلفی ممکن است رخ دهد که پاره‌ای از آنها عبارتند از افت شدید فشارخون (شوک) و احیای متعاقب آن، در جریان عمل جراحی پیوند کلیه، اعمال جراحی مانند خارج کردن سنگ‌های بزرگ شاخ گوزنی با جراحی باز، نفرکتومی پارشیال یا اعمال جراحی آنورسیم‌های آئورت که در آنها نیاز به کلامپ موقت شریان کلیوی یا آئورت است [۳]. نکته قابل توجه این است که در اکثر موارد آسیب ایسکمیک کلیه قابل پیش بینی است؛ لذا اگر بتوان از قبل بافت کلیه را در برابر این نوع آسیب مقاوم‌تر کرد، می‌توان از موارد ARF کاست.

از سال ۱۹۸۶ که موری و همکاران پدیدهٔ جالب Ischemic Preconditiong (IPC) را در بافت قلب کشف کردند امیدهای زیادی برای موفقیت در جلوگیری از آسیب IR در بافت‌های مختلف پدید آمده است. آنها متوجه شدند که مواجه شدن قلب سگ با دوره‌های کوتاه مدت IR می‌تواند آنرا در برابر آسیب IR طولانی‌تر مقاوم‌تر کند [۱۹]. وجود این پدیده که IPC نام گرفت در بافت‌های بسیار دیگری چون مغز [۱۴]، نخاع [۳۱]، معده[۲۱]، روده [۳۰] و کلیه [۱۶] هم به اثبات رسید. هر چند امکان ایجاد IPC (توسط دوره‌های کوتاه مدت IR) در بافت کلیه چند سال بعد از کار موری و همکاران به اثبات رسید ولی امکان مقاوم‌تر کردن بافت کلیه در برابر عوامل آسیب رسان دیگری چون اورانیوم توسط مقادیر کمتر همان مادهٔ آسیب‌رسان از سالها قبل یعنی حدود سال ۱۹۱۲ به اثبات رسیده بود [۲].

شناخت مکانیسم های دخیل در ایجاد IPC ممکن است در نهایت منجر به کشف داروهای مناسبی برای تقلید این پدیده شود؛ لذا بررسی روشهای مختلف IPC از اهمیت ویژه‌یی برخوردار است. از آنجا که کمترین زمان لازم برای ایجاد IPC در بررسی های قبلی ۲ دقیقه گزارش شده است و در این مورد تنها یک بررسی انجام شده است [۴] در این مطالعه بر آن شدیم که یک بار دیگر اثر اعمال چند دوره ۲ دقیقه ایسکمی-۵ دقیقه خونرسانی مجدد را بر آسیب IR آسیب رسان بعدی بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر ویستار ۲۰۰ تا ۳۰۰ گرمی برای مطالعه انتخاب شدند که تا قبل از بیهوشی دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. روشهای اجرایی این طرح از نظر اخلاقی در کمیته پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شدند. موشهای صحرایی به طور تصادفی در گروههای مربوطه قرار گرفته و توسط تزریق i.p. پنتوباربیتال (۵۰mg/kg) بیهوش می‌شدند. ۳۰۰ واحد هپارین و ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین به صورت i.p. تزریق شده سپس لاپاراتومی در خط وسط صورت می‌گرفت و پس از بستن عروق کلیوی توسط نخ سیلک ۲ صفر، نفرکتومی در سمت راست انجام می‌شد. آنگاه شریان و ورید کلیوی چپ به آرامی از یکدیگر جدا می‌شدند. بعد از گذشت حدود ۳۰ دقیقه که برای تثبیت وضعیت حیوان در نظر گرفته می‌شد، شریان کلیوی چپ توسط یک گیره فنری ظریف به مدت ۴۰ دقیقه برای ایجاد ایسکمی مسدود می‌شد سپس گیره برداشته می‌شد تا جریان خون مجددا برقرار شود. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه از اتمام ایسکمی، عضلات شکم و پوست به صورت جداگانه بخیه می‌شدند. در گروه شم ایسکمی کلیوی اعمال نمی‌شد ولی سایر مراحل مشابه گروه IR انجام می‌شد. در گروه IPC قبل از اعمال ایسکمی ۴۰ دقیقه‌یی، سه دوره "۲ دقیقه ایسکمی-۵ دقیقه خونرسانی مجدد" نسبت به کلیه اعمال می‌شد. ایجاد ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون با توجه به تغییر رنگ کلیه تأیید می‌شد. در مطالعات قبلی با استفاده از دستگاه فلومتر لیزر داپلر اثبات شده بود که این تغییر رنگ می‌تواند روش بسیار خوبی برای تأیید ایجاد IR باشد [۲۲].

جدول۱- درجه‌بندی نکروز بافتی در توبول‌های پروگزیمال کلیه یوسیله روش جابلونسکی. اساس این درجه‌بندی برحساسیت بیشتر قطعه S_3 توبول پروگزیمال بـه ایسـکمی استوار است. با اندکی تغییر (حذف میتوز که ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی کمتر دیده می‌شود) از منبع شماره ۱۶.

Score 0 = Normal

Score 1 = Necrosis of individual cells

Score 2 = Necrosis of all cells in adjacent PCT, with survival of surrounding tubules

Score 3 = Necrosis confined to distal third of PCT with band(s) of necrosis extending across inner cortex

Score 4 = Necrosis of all 3 segments of PCT

PCT=proximal convoluted tubule

در طول عمل جراحی با استفاده از نـور گـرم‌کننـده و هیتـر میـز جراحی سعی می‌شد دمای بدن حیوان نزدیک به ۳۷ درجه نگـاه داشته شود. بر حسب مورد و به مقدار لازم در طول عمل جراحی تزریق پنتوباربیتال اضافه انجام می‌شـد. ۲۴ سـاعت بعـد مجـددا حیـوان بـا تزریـق .i.p پنتوباربیتـال بیهـوش شـده و پـس از لاپاراتومی مجدد و کلامپ موقت عروق کلیه توسـط یـک عـدد بولـداگ کلامـپ، کلیـه چـپ خـارج شـده بخشـی از آن بـرای بررسی‌های بافت‌شناسی در فرمالین ۱۰ درصد قـرار مـی‌گرفـت. نمونه خون از آئورت گرفتـه شـده پلاسـمای آن جـدا شـده و در فریزر (۲۰-) درجه نگه‌داری می‌شد.

میزان اوره پلاسما به روش آنزیمی (اوره‌آز) با کیـت شـرکت زیست‌شیمی اندازه‌گیری شد. در ایـن کیـت از روش Berthelot استفاده می‌شود. سطح کراتینین پلاسـما و ادرار بـروش ژافـه بـا استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (Hitachi 902, Japan) بـا کیـت شرکت پارس‌آزمون سنجیده شد. میزان سـدیم پلاسـما (P_{Na}) و ادرار (U_{Na}) با استفاده از دسـتگاه flame photometer (Fater Electronic 460C, Iran) سنجیده شدند. کلیـرانس کـراتینین (ClCr) از طریق فرمول مربوطه محاسبه شد و کسر دفع سـدیم (Fractional excretion of sodium = FENa%) از فرمـول ذیل محاسبه گردید:

$$FENa\% = [(U_{Na} \times UF)/(P_{Na} \times ClCr)] \times 100$$

UF=urine flow (ml/day/kg)

به منظور سـنجش سـطح متابولیـت‌هـای نیتریـک اکسـاید (نیتریـت ونیتـرات پلاسـما=NOx)، از روش اسـپکتوفتومتریک ساده و سریع Miranda استفاده شد. در این روش بعـد از احیـاء نیتـرات بـه نیتریـت بـا اسـتفاده از کلریـد وانـادیوم، واکـنش Griessبرای سنجش میزان نیتریت بکار گرفته می‌شود [۱۸].

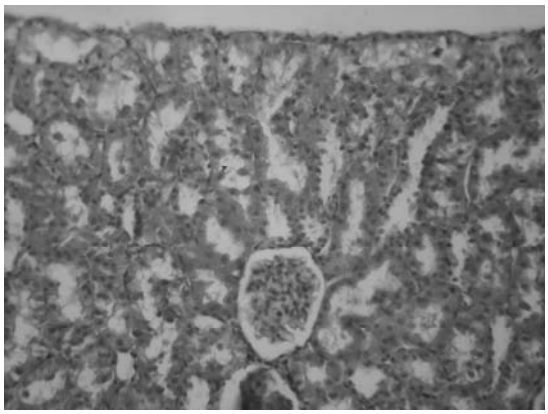
نمونه‌های بافت کلیه تثبیت شـده در فرمـالین پـس از تهیـه بلـوک پـارافینی و انجـام برشـهای ۵ میکرونـی بـروش H&E رنگ‌آمیزی می‌شدند. در برخی موارد رنگ‌آمیـزی بـروش PAS هم انجام شد. میزان نکروز بافتی بروش جابلونسکی درجه‌بنـدی شد (جدول ۲). اساس این درجه‌بندی برحساسـیت بیشـتر قطعـه S_3 توبول پروگزیمال به ایسکمی استوار است [۹].

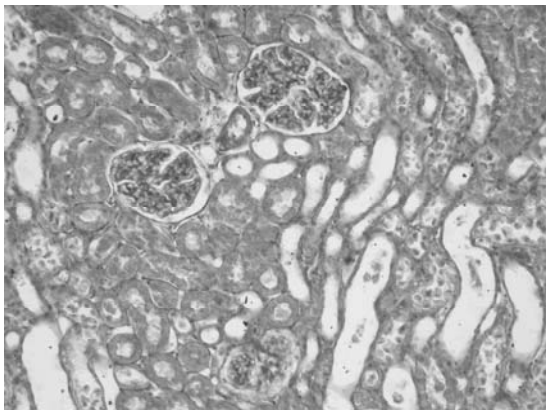
داده‌ها بصورت میانه (محدوده) نشان داده شده‌اند. برای مقایسـه داده‌ها از آزمون ناپارامتری Mann–Whitney U-test استفاده شد. برای مقایسه فراوانی داده‌هایی کـه بزرگتـر یـا کـوچکتر از مقـداری خاص بودند از آزمون Chi-Square استفاده شـد. $P<0.05$ بعنـوان سطح معنی‌دار بودن از نظر آماری در نظر گرفته شد.

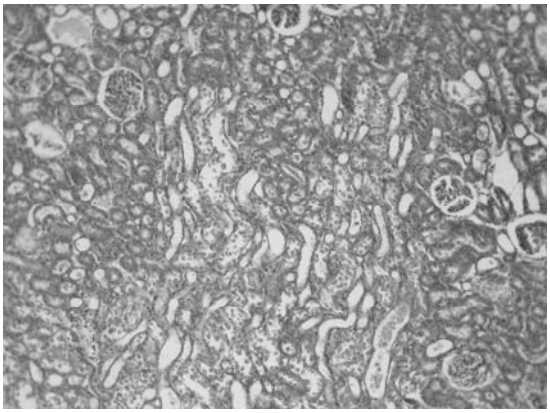
جدول۲- فراوانی درجات آسیب بافتی جابلونسکی ۰ تا ۴ در گروه‌های مختلف.

گروه	تعداد موارد				
	درجه آسیب ۰	درجه آسیب ۱	درجه آسیب ۲	درجه آسیب ۳	درجه آسیب ۴
IR* (n=8)	۰	۰	۰	۲	۶
IPC &, * (n=9)	۰	۱	۰	۷	۱
شم (n=9)	۸	۱	۰	۰	۰

&، تفاوت معنی‌دار با گروه IR *، تفاوت معنی‌دار با گروه شم







شکل ۱- A- کورتکس طبیعی کلیه در یکی از موشهای گروه IPC.

B- تعدادی توبول کلیوی نکروتیک در کورتکس کلیه یکی از موش‌های گروه IR دیده می‌شوند. این پدیده به انضمام وجود باندهای نکروزه که به نواحی تحتانی کورتکس گسترش پیدا کرده باشند معرف درجه ۴ مقیاس آسیب بافتی جایلونسکی است. همچنین به گشاد شدن برخی توبولها دقت شود.

C- باندهایی از توبول‌های نکروتیک که از نواحی بیرونی مدولا به کورتکس کلیه نفوذ کرده‌اند. این باندها در واقع معرف قطعات S_3 نکروتیک توبولهای پروگزیمال می‌باشند. وجود این پدیده در غیاب نکروز وسیع‌تر نواحی کورتیکال معرف درجه آسیب جابلونسکی ۳ است.

یافته‌ها

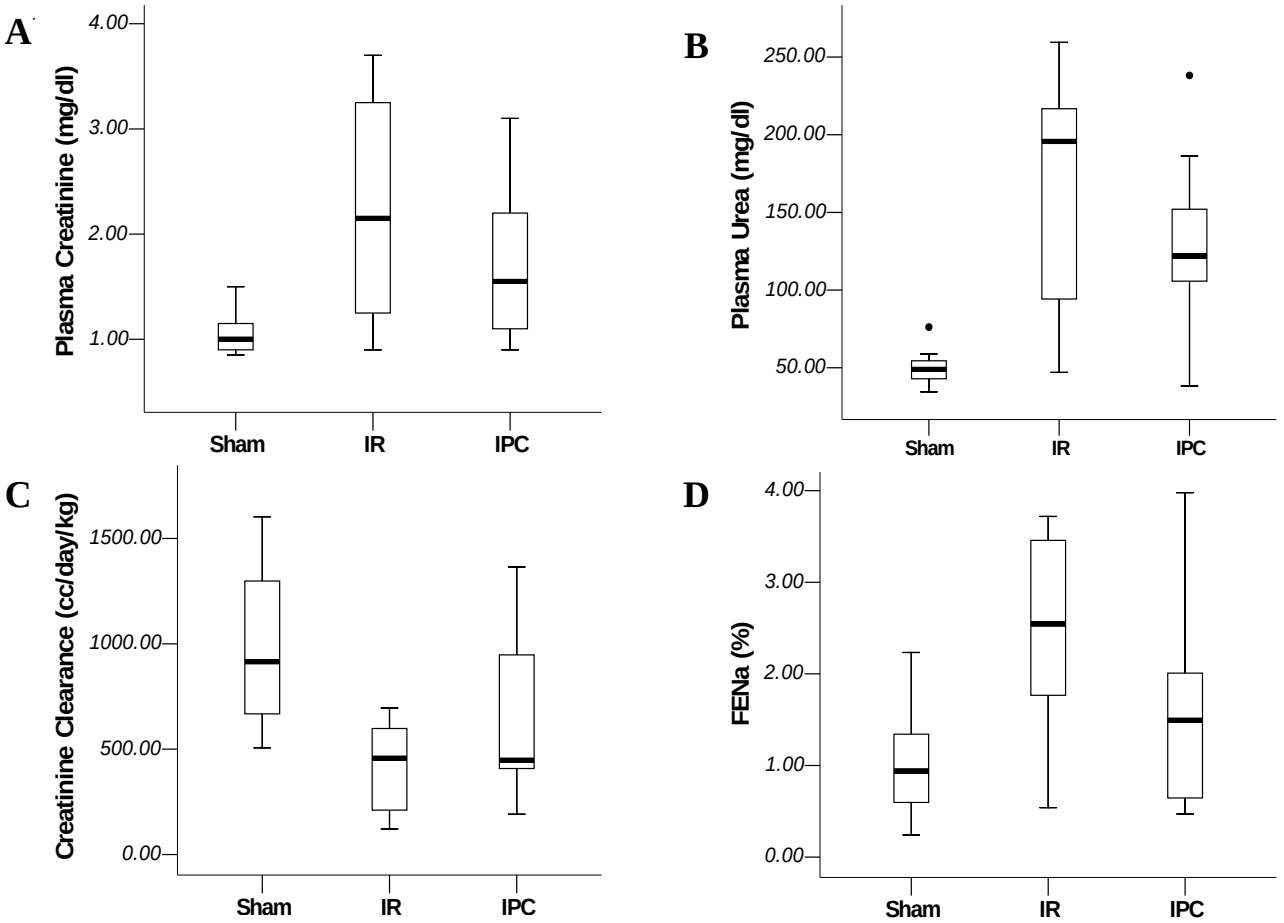
الگوی ایسکمی-خونرسانی مجدد بکار رفته در این بررسی سبب آسیب بافتی قابل توجه در بافت کلیه تمامی موش‌های صحرایی گروه IR شد (جدول ۲) و در این گروه، اوره و کراتینین پلاسما و کسر دفع سدیم به طور معنی‌داری نسبت به گروه شم افزایش داشتند. کلیرانس کراتینین نیز بطور معنی‌داری در گروه IR کمتر از گروه شم بود (شکل ۲).

درجه نکروز بافتی (جابلونسکی) در گروه IPC (میانه ۳، محدوده ۴-۱) بطور معنی‌داری کمتر از گروه IR (میانه ۴، محدوده ۴-۳) بود ($p<0.05$). از نظر درجه آسیب بافتی بین گروه شم و هر دو گروه IPC و IR تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p<0.001$). موارد با درجه جابلونسکی برابر ۴ (که به معنی وجود درجاتی از نکروز در همه قسمتهای توبول پروگزیمال یعنی S_1، S_2 و S_3 است) در گروه IPC به مراتب فراوانی کمتری از گروه IR داشتند (۱۱/۱ درصد در برابر ۷۵ درصد، $p<0.05$ Chi-square test) (جدول ۲، شکل ۱).

بین میزان کراتینین پلاسمای گروه IR وگروه IPC تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p=0.29$). مقادیر اوره پلاسما نیز بین گروههای IR و IPC تفاوت معنی‌داری نداشت ($p=0.28$). سطح کراتینین و اوره پلاسما در گروههای IR و IPC بطور معنی‌داری از گروه شم بیشتر بود ($p<0.01$). از سوی دیگر موارد با اوره بالاتر از ۱۹۰ mg/dl به طور معنی‌داری در گروه IPC فراوانی کمتری از گروه IR داشتند ($p<0.05$, Chi-square test)(شکل ۲).

کلیرانس کراتینین و کسر دفع سدیم بین گروه IR و IPC تفاوت معنی‌داری نداشتند ($p=0.2$). از سوی دیگر از نظر کسر دفع سدیم تفاوت بین گروه IPC و شم هم معنی‌دار نبود ($p=0.26$) ولی بین کلیرانس کراتینین گروههای شم و IPC تفاوت معنی‌دار بود ($p<0.05$). موارد با کسر دفع سدیم بیشتر از ۲٪ به طور معنی‌داری در گروه IPC فراوانی کمتری از گروه IR داشتند ($p< 0.05$, Chi-square test) (شکل ۲).

اعمال IR کلیوی سبب افزایش معنی‌دار مقادیر NOx پلاسما در گروه IR نسبت به گروه شم شده بود. همچنین مقادیر NOx پلاسما در گروه IPC نسبت به گروه IR بطور معنی‌داری کمتر بود و از این نظر تفاوت معنی‌داری بین گروه IPC و گروه شم وجود نداشت (شکل ۳).



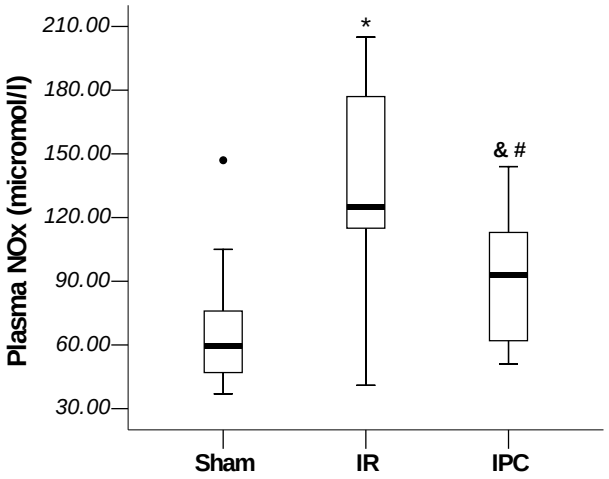
شکل۲- میانه و محدوده مقادیر کراتینین(A)، اوره پلاسما(B)، کلیرانس کراتینین(C) و کسر دفع سدیم (D) در گروه‌های شم (عدم ایسکمی)، IR (۴۰ دقیقه ایسکمی- ۲۴ ساعت خون‌رسانی مجدد) و IPC (سه دوره ۲ دقیقه ایسکمی-۵ دقیقه خون‌رسانی مجدد قبل از اعمال ایسکمی ۴۰ دقیقه‌یی اصلی). تفاوت گروه IPC و گروه IR در هیچکدام از موارد معنی‌دار نبود. در همه موارد تفاوت گروه IR با گروه شم معنی‌دار بود. کسر دفع سدیم تفاوت معنی‌داری بین گروه IPC و گروه شم نداشت. تفاوت سایر شاخص‌ها بین گروه IPC و گروه شم معنی‌دار بود (Mann–Whitney U-test). موارد با اوره بالاتر از ۱۹۰ mg/dl و نیز موارد با کسر دفع سدیم بیشتر از ۲٪ به طور معنی‌داری در گروه IPC فراوانی کمتری از گروه IR داشتند (Chi-square test). (•؛ معرف یک داده خارج از محدوده است)

بحث

در بررسی فعلی مشخص شد که اعمال سه دوره ۲ دقیقه ایسکمی-۵ دقیقه خونرسانی مجدد می‌تواند از آسیب هیستولوژیک ناشی از IR در بافت کلیه بکاهد و خصوصا موارد شدید نکروز بافتی را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. از سوی دیگر اعمال این روش IPC بطور نسبی در بهبود عملکرد کلیه هم مؤثر بوده است و موارد با اوره بالاتر از ۱۹۰ mg/dl و نیز کسر دفع سدیم بیشتر از ۲٪ در گروه IPC فراوانی کمتری از گروه IR داشتند. این روش ایجاد IPCدر یک مطالعه دیگر (Cochrane و همکاران) نیز بکار رفته است و کوتاهترین مدت ایسکمی موقت که باعث ایجاد IPC شده است همین ۲ دقیقه می‌باشد. در مطالعه Cochrane و همکاران اعمال این روش، هم در کاهش آسیب مورفولوژیک کلیه و هم درکاهش آسیب عملکردی آن مؤثر بوده است [۴].

به هر حال در تحقیق حاضر اثر IPC در بهبود عملکرد کلیه علی‌رغم کم شدن قابل توجه درجه نکروز بافتی خیلی برجسته نبود و مثلا کلیرانس کراتینین افزایش خیلی بارزی را نشان نداده بود. لازم به ذکر است که در برخی مطالعات قبلی نیز IPC وضعیت کم و بیش مشابهی را داشته است که علی‌رغم کاهش نکروز بافتی، عملکرد کلیه بهبودی نشان نداده است. روش این محققین در ایجاد IPC اعمال ۴ دروه ۴ دقیقه ایسکمی – ۱۱ دقیقه خونرسانی مجدد بوده است [۱۰].

حفاظت بافتی ناشی از IPC در بافت قلب و نیز کلیه دو مرحله زمانی دارد: مرحله زودرس که با فاصله چندین دقیقه یعد



شکل۳- میانه و محدوده مقادیرسطح پلاسمایی متابولیت‌های NO (NOx پلاسما) در گروه‌های شم (عدم ایسکمی)، IR (۴۰ دقیقه ایسکمی- ۲۴ ساعت خون‌رسانی مجدد) و IPC (سه دوره ۲ دقیقه ایسکمی-۵ دقیقه خونرسانی مجدد قبل از اعمال ایسکمی ۴۰ دقیقه‌یی اصلی). مقادیر NOx پلاسما در گروه IPC نسبت به گروه IR بطور معنی‌داری کمتر بود و از این نظر تفاوت معنی‌داری بین گروه IPC و گروه شم وجود نداشت. &، تفاوت معنی‌دار با گروه IR ، #، عدم تفاوت معنی‌دار با گروه شم، *، تفاوت معنی‌دار با گروه شم

از ایسکمی گذرا شروع شده و چند ساعت طول می‌کشد و مرحله تأخیری که از حدود ۲۴ ساعت بعد از ایسکمی گذرا شروع شده و چندین روز طول می‌کشد [۲ و ۵]. در اینجا مرحله تأخیری مد نظر ما نبوده است و هر کجا از حالت آماده‌باش صحبت می‌کنیم منظور ما مرحله زودرس آن است. از جمله روش‌هایی که قادر به ایجاد مرحله زودرس حالت آماده‌باش در برابر آسیب IR در بافت کلیه موش صحرایی بوده‌اند موارد زیر هستند:

* دو دوره ۳ دقیقه ایسکمی- ۵ دقیقه خونرسانی مجدد [۲۵]
* ۵ یا ۱۰ یا ۱۵ دقیقه ایسکمی- ۱۰ دقیقه خونرسانی مجدد (در دو تحقیق صورت گرفته ۱۵ دقیقه ایسکمی- ۱۰ دقیقه خونرسانی مجدد جواب بهتری داشته است) (۲۱-۲۰)
* مطالعه Cochrane و همکاران: یک تا سه دوره ۲ دقیقه ایسکمی- ۵ دقیقه خونرسانی مجدد [۴]
* چهار دوره ۸ دقیقه ایسکمی- ۵ دقیقه خونرسانی مجدد [۱۶]

در مواردی هم امکان ایجاد مرحله زودرس حالت آماده‌باش در بافت کلیه موش صحرایی وجود نداشته است:

* سه دوره ۵ دقیقه ایسکمی- ۵ دقیقه خونرسانی مجدد [۴]
* چهار دوره ۶ دقیقه ایسکمی- ۵ دقیقه خونرسانی مجدد [۱۶]
* چهار دوره ۴ دقیقه ایسکمی- ۱۱ دقیقه خونرسانی مجدد [۸]
* ۲۰ دقیقه ایسکمی- ۱۰ دقیقه خونرسانی مجدد [۲۳]

بررسی مکانیسم احتمالی IPC در تحقیق فعلی مد نظر نبود ولی فهم مکانیسم IPC می‌تواند ما را به راهکارهایی رهنمون شود که در آنها بافت را با الهام از مکانیسمهای ذاتی آن در برابر آسیب ایسکمی مقاوم سازیم. لذا اشاره‌یی مختصر به بررسیهای انجام شده دراین مورد خواهیم کرد هر چند در مورد مکانیسم IPC در کلیه نسبت به بافت قلب مطالعات خیلی کمتری صورت گرفته است. از جمله بررسی‌های با ارزش در این مورد تحقیقی است که توسط یک گروه از محققین در برزیل صورت گرفته است. در این تحقیق نشان داده شد که در اثر تحریک ناشی از ایسکمی‌های کوتاه مدتی که منجر به ایجاد حالت آماده‌باش می‌شوند بیان ۳۹ ژن افزایش می‌یابد. این ژن‌ها را می‌توان به سه دسته کلی تقسیم کرد: ژن‌های کدکننده chaperones/chaperonins و پروتئینهای مربوط به اسکلت سلولی که ممکن است در حفظ شکل فضایی پروتئین‌ها وساختار سلولی بعد از ایسکمی طولانی مؤثر باشند؛ ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مربوط به متابولیسم اکسیداتیو که ممکن است بعنوان تلاش سلول در کاربرد منبعی جایگزین برای انرژی یا برگرداندن سریع‌تر سطح ATP به مقادیر طبیعی مطرح باشند؛ و ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی که در حذف محصولات اکسیداتیو دخالت دارند [۶].

در بافت قلب G-پروتئینهای حساس به سم میکروب سیاه‌سرفه (Gi/o) و پروتئین کیناز C (PKC) و کانال‌های میتوکندریایی پتاسیمی حساس به ATP (کانالهای K^+_{ATP}) در ایجاد IPC دخیل هستند (۱۸). در بررسی انجام شده در مورد بافت کلیه موش صحرایی هم ثابت شده است که همانند بافت قلب- Gi/oپروتئین‌ها و PKC در ایجاد IPC دخیل هستند. از سوی دیگر گلیبنکلامید بعنوان مهار کننده کانال‌های K^+_{ATP} و پیناسیدیل بعنوان گشاینده کانال‌های K^+_{ATP} به ترتیب قادر به مهار IPC کلیوی و یا ایجاد حالت آماده‌باش نبوده‌اند؛ که این امر نشان‌دهنده عدم دخالت این کانال‌ها در حالت آماده‌باش کلیوی است [۱۷].

در مطالعه با ارزش و جدید دیگری (Joo و همکاران) که در مورد IPC در موش سوری انجام شده است نتایج ذیل بدست آمده‌اند: پیش‌درمانی با یک آنتی‌اکسیدان [N-(2-mercaptopropionyl)-glycine] برای حذف رادیکال‌های آزاد، حفاظت ناشی از IPC را از بین برده است. مهار پروتئین

کیناز C (PKC) یا G-پروتئیین‌های حساس به سم میکروب سیاه‌سرفه نیز حفاظت ناشی از IPC را کاهش داده است. مهارکننده انتخابی گیرنده‌های A_1 آدنوزینی قادر به مهار IPC نبوده و IPC در موشهای فاقد گیرنده‌های A_1 آدنوزینی پابرجا بوده است [۱۱]. در مطالعه Lee و همکاران هر چند ثابت شد آدنوزین بعنوان یک دارو می‌تواند در بافت کلیه موش‌صحرایی در برابر آسیب ناشی از IR حالت آماده‌باش ایجاد کند و یک آگونیست گیرنده‌های A_1 آدنوزینی نیز قادر به ایجاد حالت آماده‌باش کلیوی بود ولی مشخص شد که آدنوزین در حفاظت بافتی ناشی از IPC دخیل نیست؛ چرا که پیش‌درمانی با یک آنتاگونیست فوق‌العاده انتخابی گیرنده‌های A_1 آدنوزینی، IPC را مهار نکرد [۱۶]. پس ممکن است ماده‌یی (مانند آدنوزین) در ایجاد IPC دخیل نباشد ولی خود بعنوان یک دارو بتواند در ایجاد حالت آماده‌باش در برابر ایسکمی مؤثر باشد.

در مطالعه‌یی که توسط کدخدایی و همکاران در ایران انجام گرفت، نشان داده شد که IPC می‌تواند سبب حفظ سطح ویتامین E در بافت کلیه شود و این امر احتمالا ناشی از تقویت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی بوده است که قبل از ویتامین E برای حذف رادیکال‌های آزاد آسیب‌رسان وارد عمل شده‌اند [۱۲]. دسته‌یی دیگر از پروتئین‌ها که در ایجاد حفاظت در برابر ایسکمی مؤثر هستند، stress response (heat shock) proteins (HSPs) هستند. بطور کلی افزایش بیان این پروتئین‌ها پاسخی است که موجب حفاظت بسیاری از سلول‌ها در برابر انواع مختلف استرس‌ها می‌شود.HSPs به شکل‌گیری مناسب مجدد پروتئین‌ها ی تغییر شکل یافته و تجزیه متابولیت‌های توکسیک و پروتئین‌ها یی که به‌طور غیر قابل برگشت آسیب دیده‌اند کمک می‌کنند و در بازگرداندن سلول به وضعیت عادی بعد از مواجهه با عوامل آسیب‌رسان مؤثرند [۱۳].

از سوی دیگر هرچند جدا کردن الیاف عصبی منتهی به کلیه در یک مطالعه منجر به از بین رفتن IPC شده است [۲۰]؛ ولی نمی‌توان بر نقش اعصاب در ایجاد IPC بیش از حد تاکید کرد، چرا که حتی در سلول‌های کشت داده شده توبولهای کلیوی (مثلا سلول‌های HK-2 انسانی) هم امکان ایجاد حالت آماده باش در برابر آسیب ناشی از نقصان شدید ATP به وسیله ایجاد نقصان خفیف تر در ATP و نیز تحریک گیرنده‌های A_1 و A_{2a} آدنوزینی وجود داشته است که مستقل از نقش اعصاب کلیه می‌باشد [۱۵].

در بررسی فعلی ایسکمی-خونرسانی مجدد بافت کلیه سبب افزایش سطح پلاسمایی متابولیت‌های NO شد و اعمال دوره‌های کوتاه مدت ایسکمی قبل از ایسکمی اصلی باعث شد که این افزایش کمتر شود. IPC در موش صحرایی با تجویز مهارکننده غیر انتخابی NOS (L-NAME) یا مهارکننده انتخابی iNOS (aminoguanidine) از بین رفته است [۲۷] و افزایش بیان eNOS در ایجاد IPCدخیل بوده است [۲۸]. این موارد و موارد مشابه نشان‌دهنده دخالت NO در ایجاد IPC هستند ولی در مورد جزئیات نقش NO در ایجاد حالت آماده‌باش اختلاف نظرهایی وجود دارد. در چند مطالعه سطح متابولیت‌های NO متعاقب آسیب IR کلیه بررسی شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی زحمتکش و همکاران [۱] اشاره کرد که در آن مانند بررسی ماIR کلیوی باعث افزایش متابولیت‌های NO شده است. از سوی دیگر در بررسی Jefayri و همکاران اعمال ۴ دوره ۴ دقیقه ایسکمی-۱۱ دقیقه خونرسانی مجدد قبل از ایسکمی ۴۵ دقیقه‌یی بر خلاف مطالعه ما تأثیر چندانی در تغییر سطح متابولیت‌های NO نسبت به گروهی که تنها ایسکمی ۴۵ دقیقه‌یی دریافت کرده‌اند نداشته است. البته علاوه بر تفاوت روش ایجاد حالت آماده‌باش در این مطالعه با بررسی ما، طول دوره خونرسانی مجدد در این بررسی بر خلاف مطالعه ما تنها ۶ ساعت بوده است [۱۰]. نشان داده شده است که اعمال ۴۵ دقیقه ایسکمی-۲۴ ساعت خونرسانی مجدد می‌تواند سبب افزایش بیان ژن ایزوفرم‌های اندوتلیال و القاءپذیر آنزیم نیتریک اکساید سینتاز (eNOS و iNOS) شود [۲۸ و ۲۹] و همین امر می‌تواند دلیل افزایش متابولیت‌های NO پلاسما متعاقب اعمال IR باشد. قاعدتا IPC باعث تعدیل این اثر IR بر بیان ژن ایزوفرم‌های آنزیم نیتریک اکساید سینتاز شده‌است ولی در مورد جزئیات این امر نیاز به بررسی بیشتر و با روش‌های دقیق‌تر است.

بطور خلاصه در مطالعه فعلی مشخص شد که اعمال ۳ دوره ۲ دقیقه ایسکمی-۵ دقیقه خونرسانی مجدد می‌تواند شدت نکروز بافتی کلیه موش صحرایی ناشی از ۴۰ دقیقه ایسکمی-۲۴ ساعت خونرسانی مجدد را کاهش دهد و تا حدودی نیز عملکرد کلیه را بهبودی بخشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از مرکز تحقیقات تروما دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله و نیز دانشگاه علوم پزشکی لرستان که با حمایت مالی امکان انجام تحقیق فعلی را مهیا ساختند تشکر می‌نمایند. همچنین از زحمات سرکار خانم مهندس صفیه اوتادی، آقای دکتر اصغر قاسمی، خانم عرب سلمانی و آقای دکتر مسعود ثقفی بجهت زحماتشان در انجام این طرح تشکر می‌شود.

منابع

[۱] زحمتکش مریم، کدخدایی مهری، عرب حسینعلی، احدی علی، کاهش ضایعات ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد به وسیله L-Nil در کلیه موش صحرایی نر. فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۰ (۱۳۸۵) ۶۳ تا ۶۹.

[2] Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning. ***Curr Opin Nephrol Hypertens*** 11 (2002) 43-48.

[3] Bouchier-Hayes DM, Fitzpatrick JM, In: Grace PA, Mathie RT, editors. ***Ischemia-reperfusion injury.*** London: Black Well Science, 1999.

[4] Cochrane J, Williams BT, Banerjee A, Harken AH, Burke TJ, Cairns CB, Ischemic preconditioning attenuates functional, metabolic, and morphologic injury from ischemic acute renal failure in the rat. ***Ren Fail*** 21 (1999) 135-145.

[5] Cohen MV, Baines CP, Downey JM, Ischemic preconditioning from adenosine receptor to KATP channel. ***Annu Rev Physiol*** 62 (2000) 79-109.

[6] Gomes MD, Cancherini DV, Moreira MA, Reboucas NA, Ischemic preconditioning of renal tissue: identification of early up-regulated genes. ***Nephron Exp Nephrol*** 93 (2003) 107-116.

[7] Hilton R, Acute renal failure. ***BMJ*** 333 (2006) 786-790.

[8] Islam CF, Mathie RT, Dinneen MD, Kiely EA, Peters AM, Grace PA, Ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney: the effect of preconditioning. ***Br J Urol*** 79 (1997) 842-847.

[9] Jablonski P, Howden BO, Rae DA, Birrell CS, Marshall VC, Tange J, An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia. ***Transplantation*** 35 (1983)198-204.

[10] Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT, Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. ***BJU Int*** 85 (2000) 1007 -1013.

[11] Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. ***J Am Soc Nephrol*** 17 (2006) 3115-3123.

[12] Kadkhodaee M, Aryamanesh S, Faghihi M, Zahmatkesh M, Protection of rat renal vitamin E levels by ischemic-preconditioning. ***BMC Nephrol*** 28 (2004) 5-6.

[13] Kelly KJ, Stress response proteins and renal ischemia. ***Minerva Urol Nefrol*** 54 (2002) 81-91.

[14] Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. ***Brain Res*** 528 (1990) 21–24.

[15] Lee HT, Emala CW, Preconditioning and adenosine protect human proximal tubule cells in an in vitro model of ischemic injury. ***J Am Soc Nephrol*** 13 (2002) 2753-2761.

[16] Lee HT, Emala CW, Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A1 and A3 receptors. ***Am J Physiol Renal Physiol*** 278 (2000) F380–F387.

[17] Lee HT, Emala CW, Protein kinase C and G(i/o) proteins are involved in adenosine- and ischemic preconditioning-mediated renal protection. ***J Am Soc Nephrol*** 12 (2001) 233-240.

[18] Miranda KM, Espey MG, Wink DA, A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. ***Nitric Oxide*** 5 (2001) 62-71.

[19] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. ***Circulation*** 74 (1986)1124–1136.

[20] Ogawa T, Mimura Y, Kaminishi M, Renal denervation abolishes the protective effects of ischaemic preconditioning on function and haemodynamics in ischaemia-reperfused rat kidneys. ***Acta Physiol Scand*** 174 (2002) 291-297.

[21] Pajdo R, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Konturek SJ, Sliwowski Z, Pawlik M, Ptak A, Drozdowicz D, Hahn EG, Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves. ***Eur J Pharmacol*** 427 (2001) 263–276.

[22] Rasoulian B, Jafari M, Noroozzadeh A, Mehrani H, Wahhab aghai H, Hashemi Madani SMH, Asgari A,

Esmaili M, Khoshbaten A, Effects of ischemia-reperfusion on rat renal tissue antioxidant systems and lipid peroxidation. ***Acta Med Iran*** 2008 (in press)

[23] Riera M, Herrero I, Torras J, Cruzado JM, Fatjo M, Lloberas N, Alsina J, Grinyo JM, Ischemic preconditioning improves postischemic acute renal failure. ***Transplant Proc*** 31 (1999) 2346-2347.

[24] Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A, Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. ***J Clin Invest*** 114 (2004) 5-14.

[25] Sugino H, Shimada H, Tsuchimoto K, Role of adenosine in renal protection induced by a brief episode of ischemic preconditioning in rats. ***Jpn J Pharmacol*** 87 (2001)134 – 142.

[26] Thadhani R, pascual M, Bonventre J, Acute renal failure. ***N Engl J Med*** 334 (1996) 1448-1460.

[27] Torras J, Herrero-Fresneda I, Lloberas N, Riera M, Ma Cruzado J, Ma Grinyo J, Promising effects of ischemic preconditioning in renal transplantation. ***Kidney Int*** 61 (2002) 2218-2227.

[28] Yamashita J, Ogata M, Itoh M, Yamasowa H, Shimeda Y, Takaoka M, Matsumura Y, Role of nitric oxide in the renal protective effects of ischemic preconditioning. ***J Cardiovasc Pharmacol*** 42 (2003) 419-427.

[29] Yamasowa H, Shimizu S, Inoue T, Takaoka M, Matsumura Y, Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. ***J Pharmacol Exp Ther*** 312 (2005) 153-159.

[30] Zhang Y, Wu YX, Hao YB, Dun Y, Yang SP. Role of endogenous opioid peptides in protection of ischemic preconditioning in rat small intestine. ***Life Sci*** 68 (2001) 1013–1019.

[31] Zvara DA, Colonna DM, Deal DD, Vernon JC, Gowda M, Lundell JC, Ischemic preconditioning reduces neurologic injury in a rat model of spinal cord ischemia. ***Ann Thorac Surg*** 68 (1999) 874–880.