اثرات ال- کارنیتین و آلفا- توکوفرول بر روی نقص دفع اسید ناشی از انسداد حاد میزنای در رت‌های بیهوش

سعید چنگیزی آشتیانی*[1]
سیدمصطفی شیدموسوی[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 ارولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

*نویسنده مسئول، اراک، میدان بسیج، دانشگاه علوم پزشکی اراک. ایران
تلفن: ۴۱۷۳۵۲۶- ۰۸۶۱
email: ashtiyani@sums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۹/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: انسداد میزنای سبب استرس اکسیداتیو، تضعیف متابولیسم انرژی و نقص دفع اسید در کلیه می‌گردد. هدف این مطالعه بررسی اثرات ال- کارنیتین به‌عنوان کوفاکتور تسهیل‌کننده اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری و نیز زداینده رادیکال‌های آزاد و همچنین آلفاتوکوفرول به‌عنوان قویترین آنتی‌اکسیدان بر روی این اختلالات کلیوی در ساعات اولیه بعد از رفع انسداد حاد یک‌طرفه میزنای می‌باشد. ***روش بررسی:*** میزنای چپ تحت بیهوشی در ۶۰ رت مسدود ال- کارنیتین، آلفاتوکوفرول یا حامل‌شان (نرمال سالین و روغن زیتون) در چهار گروه مختلف به‌صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق شد. هر رت مجدداً بیهوش و کانول‌گذاری گردید و انسداد میزنای دقیقاً ۲۴ ساعت بعد از القای انسداد یک‌طرفه میزنای باز شد. طی یک دوره ۳۰ دقیقه کلیرانس جمع‌آوری جداگانه ادرار از دو کلیه صورت گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده ادرار و خون شریانی به سنجشگرهای خودکار داده شدند، و سطوح مالون دی‌آلدئید (MDA)، ATP و ADP در کلیه‌ها اندازه‌گیری گردیدند. گروه‌های شاهد و کنترل نیز وجود داشتند (n=۸-۱۰ در هر گروه). ***یافته‌ها:*** در کلیه پس انسدادی گروه‌های دریافت‌کننده حامل نسبت به کلیه معادل در گروه شاهد، مقادیر MDA ($p<۰/۰۰۱$)، ADP ($p<۰/۰۱$)، pH ($p<۰/۰۰۱$) ادراری و دفع مطلق ($p<۰/۰۵$) و نسبی بی‌کربنات ($p<۰/۰۱$) افزایش، ATP، ATP/ADP (هر دو $p<۰/۰۰۱$) و PCO_2 ($p<۰/۰۱$) ادراری کاهش نشان دادند. آلفاتوکوفرول توانست سطح MDA را به‌حد طبیعی بازگرداند اما تاثیری بر مقادیر تغییر یافته شاخص‌های متابولیسم انرژی و دفع اسید- باز نداشت، در حالی‌که ال- کارنیتین همه آنها به‌جز افت PCO_2 ادراری را بهبود بخشید. ***نتیجه‌گیری:*** دفع بی‌کربنات افزایش یافته در کلیه پس انسدادی به‌علت نقص ترشح اسید در مجاری جمع‌کننده می‌باشد و به متابولیسم انرژی تضعیف شده و استرس اکسیداتیو کلیوی ناشی از انسداد میزنای مرتبط نمی‌باشد.

کلمات کلیدی: انسداد میزنای، آلفا توکوفرول، ال- کارنیتین، استرس اکسیداتیو، تعادل اسید- باز، رت

مقدمه

بیماری کلیوی انسدادی به بیماری اطلاق می‌شود که ناشی از تضعیف یا توقف جریان ادرار بر اثر ایجاد یک مقاومت ساختاری در برابر آن در هر نقطه از مجرای ادراری باشد، که باعث افزایش فشار در قسمت پروگزیمال نقطه تنگ یا مسدود شده می‌گردد. افزایش فشار برگشتی مستقیماً به پارانشیم کلیه آسیب می‌رساند و منجر به برقراری اختلالات متعددی از جمله اختلال در تعادل اکسیداتیو، متابولیسم انرژی، همودینامیک و عملکرد دفعی کلیه می‌شود.[1] در این مطالعه از مدل انسداد ۲۴ ساعته و یک‌طرفه میزنای Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) استفاده گردید تا وضعیت نقص حاصل از UUO حاد و همچنین چگونگی اختلالات در وضعیت اسید و باز و دفع بی‌کربنات در طی ساعات اولیه بعد از رفع انسداد میزنای یک‌طرفه Release of Unilateral Ureteral Obstruction (RUUO) حاد در کلیه درگیر و کلیه طرف مقابل تعیین شوند. ال- کارنیتین ماده‌ای است که از طریق تسهیل انتقال اسیدهای چرب به داخل ماتریکس میتوکندری و تحریک بتا اکسیداسیون آنها باعث افزایش تولید ATP می‌شود و به‌علاوه دارای خاصیت آنتی- اکسیدانی هم می‌باشد.[2و3] بنابراین، اثرات بهبودی بخش ال- کارنیتین

بر استرس اکسیداتیو و نقص متابولیسم هوازی حاصل از UUO حاد در بافت کلیه و همچنین بر روی اختلالات عملکرد کلیوی در ساعات اولیه RUUO بررسی گردید. به‌علاوه، به‌منظور تعیین رابطه بین خواص آنتی‌اکسیدانی و تحریک متابولیسم هوازی ال- کارنیتین و همچنین تفکیک اثرات آنها از یکدیگر بر روی اختلالات عملکرد کلیوی، از ویتامین- ای به‌عنوان یک داروی شاخص آنتی‌اکسیدان استفاده شد. مطالعات سال‌های اخیر همگی حکایت از نقش ال- کارنیتین به‌عنوان یک عامل درمانی در طیف وسیعی از اختلالات کلینیکی شامل نارسایی کلیوی، بیماری‌های میوکاردیال، بیماری‌های عروق محیطی و هیپرلیپیدمی دارند.[۴] به‌واسطه ویژگی‌های متعدد و بعضاً منحصر به‌فرد ال- کارنیتین در مهار استرس اکسیداتیو، افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی، بهبود و تقویت اکسیداسیون اسیدهای چرب، کاهش التهاب و اینفیلتراسیون نوتروفیل‌ها، استفاده از آن به‌عنوان یک داروی موثر در مقادیر و روش تجویز متنوع در بسیاری از بیماری‌ها و بالخصوص بیماری‌های کلیوی گسترش یافته است. با این‌حال استفاده از ال- کارنیتین به‌عنوان درمان دارویی بیماری‌های نفروپاتی انسدادی و اختلالات ناشی از آن تاکنون صورت نپذیرفته است و اطلاعات محدودی در تاثیر این ماده در این بیماری‌ها وجود دارد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تجربی (Experimental) است. آزمایشات طی سال‌های ۱۳۸۵-۱۳۸۴ در بخش فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و بر روی ۶۰ عدد رت نر نژاد اسپراگ- دالی در محدوده وزنی ۳۵۰-۲۵۰ گرم تهیه شده از مرکز پرورش دانشگاه علوم پزشکی شیراز و در شش گروه صورت پذیرفت. رت‌ها در قفس‌های جداگانه در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در محدوده حرارتی ^{o}c۲±۲۳ و دسترسی دل‌خواه به مقادیر دلخواه آب و غذا نگهداری می‌شدند. جهت القای UUO، رت‌ها با اتر به‌صورت سبک بیهوش و میزنای چپ آنها تحت یک جراحی استریل مسدود می‌شدند.[۵] بر اساس انجام جستجوی گسترده در منابع موجود میزان ال- کارنیتین (LC) به میزان ۲۰۰mg/kg یا نرمال سالین (NS) به‌عنوان حامل آن برای دو بار ۱۵ دقیقه قبل و ۱۲ ساعت بعد از القای UUO و فعال‌ترین فرم ویتامین- ای (Vit- E) یعنی دی‌آلفا توکوفرول به‌میزان ۵۰mg/kg یا روغن زیتون (OO) به‌عنوان حامل آن برای دوبار شش ساعت قبل و ۹ ساعت بعد از القای UUO، همگی با حجم ۱ml به‌صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق می‌گردیدند. رت‌های شاهد دارای تمام مراحل جراحی بدون انسداد میزنای به‌همراه دریافت نرمال سالین، ولی رت‌های کنترل فاقد آنها بودند. رت‌ها در پروتکل RUUO، حدود ۲۱ ساعت بعد از القای UUO در چهار گروه انسدادی شامل گروه‌های RUUO+LC (n=۸)، RUUO+NS (n=۹)، RUUO+VitE (n=۱۰) و RUUO+OO (n=۹)، معادل همین مدت در گروه شاهد (Sham-R, n=۸) و بلافاصله در گروه کنترل (Control-R, n=۸) هر رت با پنتوباربیتال بیهوش و بعد از جراحی و کانول‌گذاری جهت اندازه‌گیری پارامترهای عملکرد دفعی و همودینامیک کلیه آماده می‌شدند. سپس به حیوان ۱/۵ ساعت استراحت داده می‌شد و یک دورهٔ کلیرانس ۳۰ دقیقه‌ای قبل از رفع انسداد (Pre-RUUO) برای کلیه راست صورت می‌پذیرفت. گره میزنای چپ بعد از گذشت دقیقاً ۲۴ ساعت از القای UUO باز شده (در گروه‌های شاهد و کنترل وجود ندارد) و دو ساعت بعد نمونه‌های ادراری از هر کلیه به‌طور جداگانه در طی و نمونه‌های خون شریانی در پایان هر یک از دوره‌های کلیرانس جمع‌آوری می‌شدند. جهت ارزیابی وضعیت اسید- باز بدن و دفع بی‌کربنات ادراری، برای مدتی ادرار هر دو کلیه به‌طور مجزا در زیر ۳۰mm پارافین مایع جمع‌آوری و در انتها یک نمونه خون شریانی گرفته و به دستگاه آنالیز کننده گازهای خونی داده می‌شدند در پایان 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 ^{o}C۸۰- ذخیره می‌گردیدند.

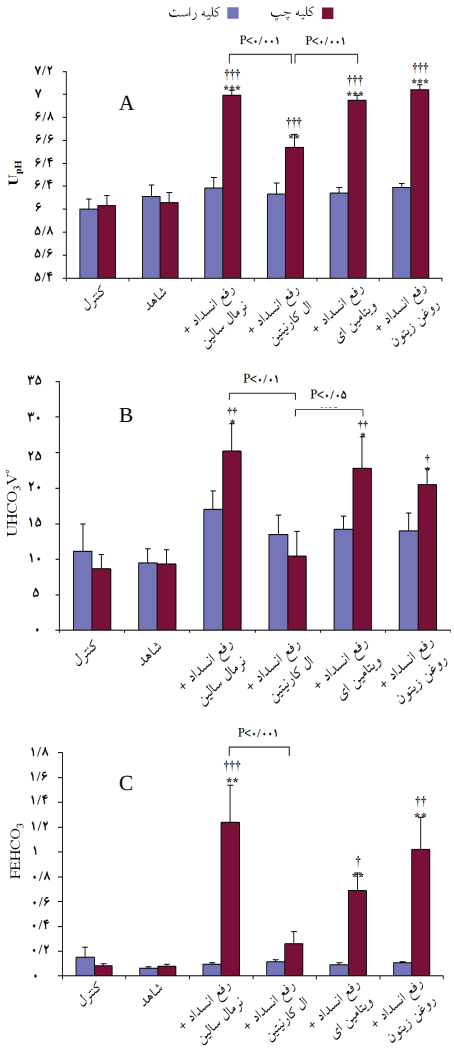
اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی: اندازه‌گیری Malondialdehyde (MDA): برای تعیین میزان آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو از شاخص MDA که فرآورده نهایی پراکسیداسیون لیپیدی توسط ROS است کمک گرفته شده و میزان آن در بافت کلیوی با استفاده از روش Ohkawa مشخص می‌گردید.[۶] به‌طور خلاصه، ابتدا بعد از خارج کردن 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 می گردید. اسید تری‌کلرواستیک اسید (TCA) و تیوباربیتوریک اسید (TBA) به این محلول همگن اضافه می‌شد تا واکنش MDA با تیوباربیتوریک اسید در دمای ^{o}C۱۰۰-۹۵ و در PH=۳/۵ انجام گردد. بعد از تشکیل یک کمپلکس

صورتی رنگ و استخراج آن با n- بوتانول، جذب در ۵۳۲nm با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و با منحنی استاندارد حاصل از تترامتوکسی پروپان مقایسه و مقدار عددی بر حسب (نانومول به ازای هر گرم وزن کلیه) nmol/gKW گزارش می‌گردید.[۵]

تعیین وضعیت متابولیسم: اندازه‌گیری سطوح Adenosine Triphosphate (ATP) و Adenosine Diphosphate (ADP) در بافت کلیوی بر اساس روش Lundine صورت گرفت.[۷] 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 می گردید. 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 می گردید. 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. مقادیر به‌دست آمده ATP در هر دو مرحله با منحنی استاندارد ATP مقایسه و مقدار عددی بر حسب µmol/Gkw گزارش می‌شد.[۵و۸] مقادیر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و متابولیسمی به صورت میانگین± خطای معیار (Mean±SE) ارائه و تحلیل‌آماری با نرم‌افزار آماری SPSS ویراست ۱۱/۵ و با در نظر گرفتن p<۰/۰۵، انجام گرفت. 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 با در نظر گرفتن p<۰/۰۵ استفاده گردیدند.

یافته‌ها

جداول ۱ و ۲ به‌ترتیب تغییرات در مقادیر MDA و همچنین میزان تغییرات در پارامترهای شاخص عملکرد متابولیسمی (ATPT، ADP، ATP/ADP) را در کلیه‌های راست و چپ در گروه‌های مختلف مورد



نمودار- ۱: مقایسه مقادیر ادراری A) اسیدیته (U_{pH})، B) دفع مطلق بی‌کربنات ($UHCO_3V^{\circ}$)، و C) دفع نسبی بی‌کربنات ($FEHCO_3$) بین کلیه راست (RK) و کلیه چپ (LK) در هر گروه و همچنین برای هر کلیه بین گروه‌های مختلف. مقادیر به‌صورت میانگین± خطای معیار بعد از گذشت حدود دو ساعت از رفع انسداد در رت‌های مبتلا شده به ۲۴ ساعت انسداد میزنای یک‌طرفه چپ (RUUO) دریافت‌کننده ال- کارنیتین به میزان ۲۰۰mg/kgBW (گروه RUUO+LC) یا نرمال‌سالین به‌عنوان حامل آن (گروه RUUO+NS) و ویتامین- E به‌میزان ۵۰ mg/kgBW (گروه RUUO+Vit E) یا روغن زیتون به‌عنوان حامل آن (گروه RUUO+OO) به‌صورت i.p. برای دو بار قبل و بعد از انسداد میزنای می‌باشند. در رت‌های شاهد (گروه Sham-R) مراحل جراحی بدون انسداد میزنای با دریافت نرمال‌سالین صورت گرفت، در حالی‌که در رت‌های کنترل (گروه Control-R) انجام نگردیده‌اند. $^{*}p<۰/۰۵$، $^{**}p<۰/۰۱$، $^{***}p<۰/۰۰۱$ مقایسه بین RK (کلیه راست) با LK (کلیه چپ) با یکدیگر در هر دوره. $^{\dagger}p<۰/۰۵$، $^{\dagger\dagger}p<۰/۰۱$، $^{\dagger\dagger\dagger}p<۰/۰۰۱$ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) با گروه شاهد مربوطه در هر دوره.

جدول- ۱: مقایسه مقادیر مربوط به مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde (MDA طی دو ساعت بعد از رفع انسداد ۲۴ ساعت میزنای یک‌طرفه در نمونه‌های بافت کلیوی

گروه‌ها	کنترل		شاهد		انسداد یک‌طرفه میزنای+ نرمال سالین		انسداد یک‌طرفه میزنای+ ال- کارنیتین		انسداد یک‌طرفه میزنای+ ویتامین- E		انسداد یک‌طرفه میزنای+ روغن زیتون	
پارامترها												
	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK	RK	LK
MDA (nmol/gKW)	۲/۷±۳۶/۳	۰/۹±۳۷/۸	۱/۳±۳۵/۶	۱/۶±۳۶/۰	۰/۹±۴۱/۷ † ¥	۱/۱±۳۷/۴ *** ††† ¥¥¥	۲/۴±۳۵/۴	۱/۴±۴۴/۵ ** ##	۰/۹±۳۰/۹	۱/۸±۳۷/۸ *** †††	۱/۲±۴۱/۳ † ###	۲/۱±۵۸/۳ *** ††† ###

$p<0/05^{*}$، $p<0/01^{**}$، $p<0/001^{***}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) با LK (کلیه چپ) با یکدیگر در هر دوره. $p<0/05^{\dagger}$، $p<0/01^{\dagger\dagger}$، $p<0/001^{\dagger\dagger\dagger}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) با گروه شاهد مربوطه در هر دوره. $p<0/05^{\#}$، $p<0/01^{\#\#}$، $p<0/001^{\#\#\#}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) گروه UUO+Vit E با سایر گروه‌های انسدادی. $p<0/05^{¥}$، $p<0/001^{¥¥}$، $p<0/001^{¥¥¥}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) گروه UUO+LC با سایر گروه‌های انسدادی.

جدول- ۲: مقایسه مقادیر مربوط به شاخص‌های متابولیسمی (ATP, ADP, ATP/ADP) طی دو ساعت بعد از رفع انسداد ۲۴ ساعت میزنای یک‌طرفه در نمونه‌های بافت کلیوی

گروه‌ها	کنترل		شاهد		انسداد یک‌طرفه میزنای+ نرمال سالین		انسداد یک‌طرفه میزنای+ ال-کارنیتین		انسداد یک‌طرفه میزنای+ ویتامین- E		انسداد یک‌طرفه میزنای+ روغن زیتون	
پارامترها												
	RK	LK	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	۲/۸۶±۰/۲۳	۱/۰۹±۰/۱ ** †† ¥¥	۳/۵۴±۰/۳۱ ††	۱/۵۳±۰/۱۳ ** ##	۲/۸۹±۰/۲۳	۱/۰۶±۰/۱۳ *** ††	۲/۸۶±۰/۲۳	۱/۰۲±۰/۸ *** †††
ADP (µmol/gKW)	۰/۴۸±۰/۰۴	۰/۴۸±۰/۰۵	۰/۴۵±۰/۰۴	۰/۴۷±۰/۰۵	۰/۸۲±۰/۰۸ † ¥	۰/۶۷±۰/۰۴†	۱/۵۳±۰/۱۳	۲/۸۹±۰/۲۳†	۱/۰۶±۰/۱۳†	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	۳/۷۳±۰/۳۱ ¥¥¥	۱/۶۴±۰/۱۴ *** †††¥¥	۵/۸۷±۰/۷ ††† ###	۳/۱۲±۰/۳۳ ** ###	۳/۹۶±۰/۵۳	۱/۷۴±۰/۱۷ *** †††	۴/۰۷±۰/۴۲	۱/۶۷±۰/۱۹ *** †††

$p<0/05^{*}$، $p<0/01^{**}$، $p<0/001^{***}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) با LK (کلیه چپ) با یکدیگر در هر دوره. $p<0/05^{\dagger}$، $p<0/01^{\dagger\dagger}$، $p<0/001^{\dagger\dagger\dagger}$ 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+Vit E با سایر گروه‌های انسدادی. $p<0/05^{¥}$، $p<0/001^{¥¥}$، $p<0/001^{¥¥¥}$ مقایسه بین RK (کلیه راست) و LK (کلیه چپ) گروه UUO+LC با سایر گروه‌های انسدادی.

جدول- ۳: مقایسه مقادیر PCO_2 ادراری در کلیه راست و چپ طی دو ساعت بعد از رفع انسداد ۲۴ ساعته میزنای

	P_UCO_2 (mmHg)	
گروه‌ها	کلیه چپ	کلیه راست
کنترل	۴۳/۹±۳/۲	۴۹/۷±۴/۵
شاهد	۴۷/۶±۳/۱	۴۲/۶±۳/۰
رفع انسداد میزنای+ نرمال سالین	۳۶/۳±۲/۶††	۵۵/۷±۴/۶
رفع انسداد میزنای+ ال- کارنیتین	۳۱/۴±۳/۱††	۴۷/۹±۳/۵
رفع انسداد میزنای+ ویتامین ای	۳۳/۵±۲/۳††	۵۷/۷±۴/۲
رفع انسداد میزنای+ روغن زیتون	۳۴/۷±۳/۵††	۵۴/۴±۳/۹

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

مطالعه طی ساعات اولیه رفع انسداد ۲۴ ساعته UUO نشان می‌دهند. اطلاعات موجود در جدول ۳ نشان می‌دهد که میزان Pco_2 ادراری (PUco2) به‌طور معنی‌داری در تمام گروه‌های انسدادی در کلیه انسدادی در مقایسه با کلیه غیر انسدادی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0/01$)، اما در گروه کنترل و شاهد چنین اختلافی بین کلیه‌های مشابه وجود نداشت. در گروه RUUO+NS نسبت به کلیه‌های معادل در گروه Sham-R، کلیه پس انسدادی افزایش‌هایی را در دفع مطلق بی‌کربنات ($UHCO_3V°$) ۲۵/۲۱±۴/۹۰ pmol/min.gKW در مقابل ۹/۲۴±۲/۲۰، دفع نسبی بی‌کربنات (FE_{HCO3}) ۱/۱۶±۰/۳۱٪ در مقابل ۰/۰۸±۰/۰۲ و PH ادراری ۶/۹۹±۰/۰۵ در مقابل ۶/۰۶±۰/۰۸ داشت، ولی کلیه غیرانسدادی اختلافی را نشان نداد (نمودار ۱). بین گروه‌های RUUO+NS، RUUO+OO و RUUO+Vit E هیچگونه تفاوتی در دفع بی‌کربنات و اسید توسط هر دو کلیه وجود نداشت. در حالی‌که در گروه RUUO+LC نسبت به گروه RUUO+NS، کلیه پس انسدادی دارای مقادیر کمتر $UHCO_3V°$ ($p<0/01$) و $FEHCO_3$ ($p<0/001$) و در حد کلیه معادل در گروه Sham-R، و PH ادراری پایین‌تر ($p<0/001$، ۰/۱۱±۶/۵۵) داشت (نمودار B-۱ و C-۱).

بحث

طی ساعات اولیه بعد از رفع انسداد میزنای حضور استرس اکسیداتیو در کلیه درگیر که کانون آسیب است از طریق افزایش در تولید ROS محرز است، در حالی‌که در کلیه غیرانسدادی، افزایش

جبرانی فعالیت منجر به تولید بیشتر ROS نیز شد (جدول ۱). به‌علاوه اختلال در متابولیسم انرژی هوازی در کلیه انسدادی ایجاد گردید، به طوری‌که در بافت کلیوی مقادیر ADP افزایش ولی ATP و ATP/ADP کاهش‌هایی را نسبت به شرایط نرمال نشان دادند. اما در کلیه غیرانسدادی جهت تامین انرژی فعالیت‌های افزایش یافته خود با یک افزایش در متابولیسم انرژی به‌صورت جبرانی و طبیعی مواجه بود، به‌صورتی‌که تولید بیشتر ATP با افزایش مصرف آن همراه بود که در نتیجه ATP/ADP ثابت باقی ماند (جدول ۲)، که مکانیسم‌های مسبب برای این شرایط قبلا به‌تفصیل بحث شده است.[5] ویتامین- E داروی شاخص آنتی‌اکسیدانی کاملاً شناخته و اثبات شده می‌باشد، که در این تحقیق تجویز آن به رت‌های مبتلا شده به UUO (گروه RUUO+VitE) در حقیقت به‌عنوان گروه کنترل مثبت برای بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ال- کارنیتین علاوه بر اثرات بهبود متابولیسم هوازی آن صورت گرفته است. ویتامین- E به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غشایی که مهمترین فرم آن آلفا- توکوفرول می‌باشد می‌تواند رادیکال‌های آزاد تشکیل شده در غشاء و همچنین رادیکال‌های اکسیژنی محیط آبی اطراف غشاء را گرفته و به‌صورت سینرژستیک با مکانیزم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث حذف رادیکال‌های آزاد شده و با بروز استرس اکسیداتیو مقابله نماید.[9و10] استفاده از ویتامین- E در گروه RUUO ۲۴ ساعته، از طریق افزایش قدرت احیاءکنندگی در بافت کلیوی مانع از بروز استرس اکسیداتیو در کلیه انسدادی و کاهش میزان ROS به پائین‌تر از سطح نرمال در کلیه غیرانسدادی شد، در حالی‌که هیچگونه تاثیری بر روی مکانیزم‌های متابولیسم انرژی هوازی مختل شده در کلیه انسدادی و تحریک شده در کلیه غیرانسدادی نداشت.[8] Kheir-Eldin نیز نشان داد که دریافت خوراکی روزانه ۴۰۰IU/kg آلفا- توکوفرول به‌مدت یک هفته قبل از بروز استرس اکسیداتیو در بافت مغزی نتوانست به‌ترتیب مانع از کاهش و افزایش مقادیر ATP و ADP در این بافت گردد و لذا قادر به تعدیل معنی‌دار اختلاف به‌وجود آمده نشد، موضوعی که مولفین نیز به آن اشاره نموده‌اند.[10و11] تجویز ویتامین- E و ال- کارنیتین بعد از گذشت حدود دو ساعت از رفع انسداد از UUO ۲۴ ساعته به‌طور نسبی استرس اکسیداتیو را بهبود بخشیدند. تجویز ال- کارنیتین، باعث گردید تا در کلیه غیرانسدادی، که بعد از رفع انسداد میزنای فعالیت جبرانی آن اندکی کاهش داشته است، تولید انرژی از طریق تحریک مسیرهای متابولیسم هوازی چربی‌ها بیشتر از میزان مصرف آن باشد. نکته مهم آنکه، در کلیه پس انسدادی که بعد از رفع انسداد میزنای مصرف انرژی بیشتر شده بود، ال- کارنیتین توانست انرژی مورد نیاز را در حد کافی تامین نموده و مقادیر ATP، ADP و ATP/ADP را به حد نرمال برساند (جدول ۲). انسداد حاد میزنای باعث کاهش توانایی کلیه پس انسدادی در دفع اسید می‌گردد و CD (Collecting Duct) محل اصلی برقراری این اختلال می باشد. به‌طوری‌که با تاثیر مستقیم افزایش فشار داخلی لومنی، تغییرات همودینامیک، و عوامل فعال عروقی یا التهابی بر روی سلول‌های اینترکاله نوع A موجود در CD باعث می‌شود تا از طریق کاهش فعالیت H^+-ATPase یا توزیع آن به غشاء لومینال ترشح H^+، باز جذب بی‌کربنات کاهش یابد و به‌علاوه احتمالاً افزایش ترشح بی‌کربنات توسط سلول‌های اینترکاله نوع B هم در مختل شدن دفع اسید در کلیه پس انسدادی مشارکت دارند.[12و13] در گروه RUUO+NS، کلیه پس انسدادی در زمان حدود دو ساعت بعد از رفع انسداد میزنای ۲۴ ساعته دارای دفع مطلق بی‌کربنات ($UHCO_3V^o$) حدود ۲/۵ برابر کلیه معادل گروه شاهد بوده است (نمودار ۱B) و در نتیجه بیشتر شدن دفع بی‌کربنات، PH کلیه پس انسدادی به حدود هفت نسبت به کلیه معادل گروه شاهد با PH برابر شش افزایش یافت (نمودار ۱A). بالاتر بودن دفع نسبی بی‌کربنات ($FEHCO_3$) در کلیه پس انسدادی نسبت به کلیه معادل گروه شاهد (نمودار ۱C)، علی‌رغم کمتر بودن GFR و طبعاً بار فیلترای بی‌کربنات طی UUO، بیانگر کاهش بازجذب و یا افزایش ترشح توبولی بی‌کربنات نسبت به میزان فیلتر شده آن می‌باشد. در این مطالعه PCO_2 ادرار کلیه پس انسدادی به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از مقادیر آن در کلیه معادل گروه شاهد و کلیه غیرانسدادی بود. در شرایط طبیعی ترشح H^+ از غشاء لومینال سلول‌های اینترکاله نوع A در CD منجر به ترکیب آن با بی‌کربنات‌های داخل لومن و تشکیل H_2CO_3 می‌شود و چون آنزیم کربنیک آنهیدراز غشایی در سلول‌های CD وجود ندارد، تبدیل H_2CO_3 به CO_2 و H_2O با سرعت کم انجام گردیده و باعث می‌شود که بخشی از CO_2 در نواحی پایین‌تر CD و حتی مجاری ادراری تولید شود که قادر به بازجذب بی‌کربنات نیستند و در نتیجه PCO_2 ادرار دفعی افزایش می‌یابد. به‌هرحال کمتر بودن PCO_2 ادراری کلیه پس انسدادی نسبت به کلیه معادل گروه شاهد و عدم کاهش آن در کلیه غیرانسدادی را می‌توان

تا حدودی به نقص در بازجذب بی‌کربنات در ناحیه CD کلیه پس انسدادی مرتبط دانست. کلیه غیرانسدادی گروه RUUO+NS دارای مقادیر UpH، $UHCO_3V^o$ و $FEHCO_3$ برابر کلیه معادل گروه شاهد بود، که بیانگر عدم وجود نقص در بازجذب بی‌کربنات در این کلیه می‌باشد و از طرف دیگر نشان‌دهنده آن است که کلیه غیرانسدادی به منظور جبران افزایش دفع بی‌کربنات کلیه پس انسدادی دفع آن را کاهش نداده است. در این مطالعه هیچگونه تفاوتی برای متغیرهای مربوط به وضعیت اسید- باز خون شریانی یعنی $PaCO_2$، PHa و $[HCO_3^-]a$ بین گروه‌های RUUO+NS و Sham-R دیده نمی‌شود، بنابراین حدود دو ساعت بعد از رفع UUO ۲۴ ساعته هیچ اختلال سیستمیک اسید- باز اولیه یا جبران شده وجود نداشته است. کلیه غیر انسدادی در طول ۲۴ ساعت UUO به‌طور جبرانی دفع آب و سایر املاح را افزایش داده و احتمالاً دفع بی‌کربنات را هم به‌همراه آنها در زمان توقف عملکرد دفعی کلیه انسدادی بیشتر نموده است. در گروه RUUO+OO همانند گروه RUUO+NS، کلیه غیرانسدادی مقادیر دفع بی‌کربنات و PH ادراری برابری با کلیه معادل گروه شاهد داشت، در حالی‌که میزان‌های دفع مطلق و نسبی بی‌کربنات و PH ادرار در کلیه پس انسدادی بالاتر از کلیه معادل گروه شاهد بود (نمودار ۱)، که تاکید کننده وجود نقص در دفع اسید در این کلیه می‌باشد. مقادیر این سه پارامتر در کلیه غیر انسدادی و پس انسدادی گروه‌های RUUO+Vit E و RUUO+OO دقیقاً با هم برابرند، که بیانگر آن است که تجویز ویتامین- ای علی‌رغم برطرف نمودن شرایط استرس اکسیداتیو در کلیه پس انسدادی نتوانسته است اختلال دفع اسید در این کلیه را بهبود بخشد (جدول ۱). در گروه‌های RUUO+OO و RUUO+Vit E کلیه پس انسدادی دارای PCO_2 ادراری که سطحی پایین‌تر از کلیه مقابل خود و کلیه معادل در گروه شاهد داشتند. وجود این تفاوت‌ها حاکی از وجود نقص در ترشح H^+ و در نتیجه بازجذب بی‌کربنات در ناحیه CD کلیه پس انسدادی در هر دو گروه می‌باشد و مهم آنکه افزایش میزان ROS هم در برقراری این نقص دخیل نبوده است. در گروه RUUO+LC کلیه غیرانسدادی از لحاظ دفع اسید و بی‌کربنات همانند سایر گروه‌های که تحت UUO حاد قرارگرفته‌اند، شرایط نرمال و برابر با کلیه معادل گروه شاهد را حفظ نموده است. اما، کلیه پس انسدادی در این گروه دارای PH ادراری کمتر از گروه‌های RUUO+NS و RUUO+Vit E بود و به‌علاوه مقادیر دفع مطلق و نسبی بی‌کربنات آن افزایش نداشته و در حد کلیه معادل گروه شاهد بودند (نمودار ۱). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تجویز ال- کارنیتین از طریق بهبود وضعیت متابولیسم انرژی در سلول‌های اینترکاله نوع A باعث جلوگیری از بروز اختلال در ترشح H^+ و بازجذب بی‌کربنات حاصل از انسدادی میزنای شده است (جدول ۲). به‌هرحال، چون میزان PCO_2 ادرار در کلیه پس انسدادی گروه RUUO+LC برابر با میزان آن در کلیه پس انسدادی گروه RUUO+NS و پایین‌تر از مقادیر آن در کلیه معادل گروه شاهد و کلیه طرف مقابل خود بود (هر دو $p<0/01$)، لذا وجود نقص در ترشح H^+ در ناحیه CD کلیه پس انسدادی در گروه RUUO+LC را مشخص می‌نماید. حال این سوال مطرح می‌شود که اگر نقص در ترشح H^+ و بازجذب بی‌کربنات باقی مانده‌اند، چگونه دفع بی‌کربنات کلیه پس انسدادی در گروه RUUO+LC برابر با کلیه معادل گروه شاهد گردید. جهت یافتن پاسخ برای این سوال باید به دو نکته اشاره نمود. اول آنکه سایر مطالعات نشان داده‌اند که به‌دنبال رفع انسداد میزنای حاد، علی‌رغم افزایش دفع بی‌کربنات به‌علت نقص در بازجذب آن در ناحیه CD، بازجذب بی‌کربنات در بخش‌های ابتدایی نفرون به‌خصوص در توبول‌های پروگزیمال افزایش می‌یابد.[۱۲و۱۳] از طرف دیگر، به‌علت افت GFR و کم بودن میزان فیلتر شده بی‌کربنات و بر اساس محاسبات ذکر شده در قبل، افزایش در دفع بی‌کربنات کلیه پس انسدادی از لحاظ مقداری خیلی زیاد نمی‌باشد و به‌همین خاطر هم میزان‌های $PaCO_2$، PH a و $[HCO_3^-]a$ در بین تمام گروه‌های آزمایشی تفاوتی را با یکدیگر نشان ندادند. بنابراین می‌توان چنین پیشنهاد نمود که ال- کارنیتین از طریق بهبود نسبی متابولیسم انرژی (افزایش در تولید ATP، کاهش ADP و نسبت افزایش نسبت ATP/ADP) و تولید ATP در کلیه پس انسدادی باعث گردید تا بازجذب بی‌کربنات در PT نسبت به سایر گروه‌های انسدادی بیشتر باشد و در نتیجه میزان بی‌کربنات تحویلی به CD کمتر شود، تا علی‌رغم نقص در بازجذب بی‌کربنات در این ناحیه، میزان دفع مطلق و نسبی آن در حد شرایط نرمال باقی بماند. در کل بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان بیان داشت که بعد از گذشت نزدیک به دو ساعت از رفع انسداد میزنای، دفع بی‌کربنات و PH ادراری کلیه غیرانسدادی در حد نرمال بودند، ولی مقادیر آنها در کلیه پس انسدادی افزایش داشت، که احتمالاً به‌علت نقص در ترشح H^+ توسط سلول‌های CD و لذا کاهش

بازجذب بی‌کربنات در آنها بوده است. به‌علاوه تجویز ال- کـارنیتین، برخلاف Vit E باعث بهبود دفع بی‌کربنات و PH ادرار در کلیـه پـس انسدادی شد. ال- کارنیتین احتمالاً از طریـق افـزایش تولیـد ATP در سلول‌های PT، باز جذب بی‌کربنات را تحریک نمـوده تـا بـا کـاهش دادن میزان بی‌کربنات تحویلی به CD، جبران بی‌کربنات‌های کمتر بـاز جذب شده در این ناحیه گردد و دفع بی‌کربنات به حد نرمال برسد.

References

1. Vaughan ED Jr, Marion D, Poppas DP, Felsen D. Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York. *J Urol* 2004; 172(6 Pt 2):2563-9.
2. Ozorio RO, Van Ginneken VJ, Bessa RJ, Verstegen MW, Verreth JA, Huisman BA. Effects of exercise on l-carnitine and lipid metabolism in African catfish (Clarias gariepinus) fed different dietary l-carnitine and lipid levels. *Br J Nutr* 2009:1-12.
3. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sci* 2006; 78(8):803-11.
4. Ruff LJ, Miller LG, Brass EP. Effect of exogenous carnitine on carnitine homeostasis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1073(3):543-9.
5. Ashtiyani SC, Moosavi SMS, Hosseinkhani S, Shirazi M. Metabolic and oxidative stress indices in acute unilateral ureteral obstructive nephropathy in rat. *TUMJ* 2007; 65(7):17-23.
6. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2):351-8.
7. 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(1):47-63.
8. Ashtiyani SC, Moosavi SMS, Hosseinkhani S, Shirazi M. Effects of vitamin-E on oxidative stress and metabolism imbalance induced by acute unilateral ureteral obstruction in anaesthetized rat. *TUMJ* 2008; 665(9):617-24.
9. Ahmed RS, Suke SG, Seth V, Jain A, Bhattacharya SN, Banerjee BD. Impact of oral vitamin E supplementation on oxidative stress & lipid peroxidation in patients with polymorphous light eruption. *Indian J Med Res* 2006; 123(6):781-7.
10. Fryer MJ. Vitamin E may slow kidney failure owing to oxidative stress. *Redox Rep* 1997; 3(5-6):259-61.
11. Kheir-Eldin AA, Motawi TK, Gad MZ, Abd-ElGawad HM. Protective effect of vitamin E, beta-carotene and N-acetylcysteine from the brain oxidative stress induced in rats by lipopolysaccharide. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33(5):475-82.
12. Ribeiro C, Suki WN. Acidification in the medullary collecting duct following ureteral obstruction. *Kidney Int* 1986; 29(6):1167-71.
13. Purcell H, Bastani B, Harris KP, Hemken P, Klahr S, Gluck S. Cellular distribution of H(+)-ATPase following acute unilateral ureteral obstruction in rats. *Am J Physiol* 1991; 261(3 Pt 2):F365-76.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 10, Jan 2010: 679-686

The effects of L-carnitine and α-tocopherol on acid excretion defect during the acute ureteral obstruction in anaesthetized rats

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

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

*Corresponding author: Basij Square, Arak University of Medical Sciences, Arak., Iran.
Tel: +98-861-4173526
email: ashtiyani@sums.ac.ir

Received: September 11, 2009 Accepted: December 02, 2009

Abstract

***Background*:** Ureteral obstruction has been shown to induce renal oxidative stress, suppressed energy metabolism and defected acid excretion. This study was aimed to examine the improving effects of L-carnitine, a facilitating cofactor for mitochondrial oxidation of fatty-acids as well as a scavenger of free-radicals, and α-tocopherol as the most potent antioxidant on these renal disorders at early hours following release of unilateral ureteral obstruction.

***Methods*:** The left ureter was ligated in 60 anaesthetised rats, L-carnitine, α-tocopherol, or their vehicles (normal saline and olive oil, respectively) were injected (i.p.) in four groups. Each rat was re-anesthetized and cannulated, and ureteral legation was released at exactly 24h after UUO-induction. A 30-min clearance period performed to separately collect urine from both kidneys. The collected urine and arterial blood samples were given to pH-gas analyzer and autoanalyzer, and malondialdehyde (MDA), ATP and ADP levels were assessed in preserved kidneys. There were also sham and control groups (n=8-10 in each).

***Results*:** In the post-obstructed kidney of vehicle-treated groups with respect to the equivalent kidney of sham group, there were increases in MDA ($p<0.001$), ADP ($p<0.01$), urinary pH ($p<0.001$), absolute ($p<0.05$) and fractional bicarbonate excretions ($p<0.01$), but decreases in ATP, ATP/ADP (both $p<0.001$), and urinary PCO_2 ($p<0.01$). α-tocopherol could normalize MDA level but did not affect the altered amounts of energy metabolic indices and acid-base excretions, while L-carnitine improved all of them except of decreased urinary PCO_2.

Conclusions: Increased bicarbonate-excretion in post-obstructed kidney is due to defected acid-secretion at collecting duct, which is not related to ureteral obstruction-induced renal oxidative stress and suppressed energy metabolism.

Keywords: Ureteral obstruction, α-tocopherol, L-carnitine, oxidative stress, acid- base, equilibrium, rat.