

میزان پراکسیداسیون چربی به دنبال انسداد شریان مزانتریک فوقانی در روده رت

چکیده

دکتر پریچهر پاس بخش^{۱*}

سارا سعید نیا^۱

دکتر فرید ابوالحسنی^۱

دکتر محمد نوری موگهی^۱

دکتر محمود مافی^۱

کبری مهران نیا^۱

دکتر علیقلی سبحانی^۱

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه، تعیین میزان پراکسیداسیون چربی و پروتئین بافتی به عنوان شاخصی از تخریب بافتی پس از ایسکمی و برقراری ری‌پرفیوژن به دنبال ایجاد آسیب القائی ناشی از انسداد شریان مزانتریک فوقانی در روده و بررسی اثر محافظتی هورمون ملاتونین به عنوان جمع کننده رادیکال آزاد و آنتی اکسیدان در رت می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه از ۳۶ سر رت نر نژاد Wistar – Albino با وزن بین ۸۰-۱۲۰ گرم که به طور مساوی به شش گروه تقسیم شده بودند و دوزهای مختلف ملاتونین (mg/Kg) ۱۰، ۲۰، ۳۰) به صورت داخل عضلانی دریافت می‌کردند، استفاده شد. گروه یک: کنترل، گروه دو: sham که در این گروه عمل جراحی تا مرحله تشریح شریان مزانتریک فوقانی بر روی آنها انجام شد و حجم یکسانی از حلال به صورت داخل عضلانی به آنها تزریق گردید، گروه سه: ایسکمی-ری‌پرفیوژن، گروه چهار: ایسکمی-ری‌پرفیوژن به همراه ملاتونین با دوز ۱۰ mg/Kg، گروه پنج: ایسکمی-ری‌پرفیوژن به همراه ملاتونین با دوز ۲۰ mg/Kg و گروه شش: ایسکمی-ری‌پرفیوژن به همراه ۳۰ mg/Kg بود.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که سطح ملان دی آلدئید (MDA) بافتی به طور معنی داری در گروه ۴، ۵ و ۶ از گروه ۳ پایین تر بود ($P < 0/05$). سطح پروتئین بافتی در گروه ۴ نسبت به گروه ۳ به طور معنی داری بالاتر رفته بود ($P < 0/001$). سطح پروتئین بافتی در گروه‌های ۵ و ۶ نسبت به گروه ۳ اختلاف معنی داری را نشان نداد ($P > 0/05$).

بحث: این مطالعه نشان داد که ملاتونین با دوز ۱۰ mg/Kg، اثر آنتی اکسیدانی در جلوگیری از آسیب القائی ناشی از انسداد شریان مزانتریک فوقانی دارد.

کلمات کلیدی: پراکسیداسیون چربی، شریان مزانتریک فوقانی، ایسکمی، ری‌پرفیوژن، ملاتونین، ملان دی آلدئید

۱. بخش آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* تلفن: ۴۴۶۱۹۰۷۲

پست الکترونیک: pasbakhsh@hotmail.com

مقدمه

دارای یک یا چند الکترون جفت نشده (منفرد) و بسیار فعال می‌باشند [۴]. به نظر می‌آید رادیکال‌های آزاد در اثر تجمع و انباشته شدن هیپوگزانتین در شرایط بی‌هوازی و نیز به وسیله نوتروفیل‌های فعال شده در بافت ایسکمیک تولید می‌شوند.

در طی زنجیره انتقال الکترون میتوکندریال، رادیکال‌های آزادی که باعث تحریک از بین رفتن پروتئین می‌شوند، تولید می‌گردند. آسیب پروتئینی اکسیداتیو ممکن است بوسیله فرایندهای متابولیک ایجاد شود.

آسیب پروتئین‌ها به دو صورت می‌باشد:

۱- آسیب غیر اختصاصی (*Non-Specific (Global)*): این آسیب به وسیله گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد شده و منجر به قطعه قطعه شدن پروتئین و تغییر شکل تقریباً همه اسیدهای آمینه می‌شود.

۲- آسیب با محل معین (*site - Specific (Localized)*): وقتی اتفاق می‌افتد که ROS^۱ از قبیل هیدروکسیل OH⁻ در محل‌های اتصال یون‌های فلزی در پروتئین قرار می‌گیرد. وقتی این محل‌ها به وسیله مس یا آهن اشغال شوند، با H₂O₂ برای تولید هیدروکسیل (OH⁻) که با اسیدهای آمینه ویژه موجود در مجاورت محل‌های اتصال متال که باعث آسیب ویژه *Specific-Site* می‌شوند، واکنش می‌دهند. این آسیب تغییرات ساختمانی وسیعی را نشان نمی‌دهد. آسیب *Site - Specific* به صورت جزئی مورد مطالعه قرار گرفته که در زیر بیان می‌شود:

۱- یون‌های متال کاتالیتیک از قبیل آهن و مس، به مولکول‌های هدف مثل پروتئین، DNA یا غشاء سلولی متصل می‌شوند و هیدروکسیل (OH) که به وسیله O₂⁻ و H₂O₂ ایجاد می‌شود، در محل‌های اتصال مس یا آهن با مولکول‌های هدف واکنش می‌دهد.

۲- اثرات آسیبی هیدروکسیل (OH) در محل ویژه‌ای که

شریان مزانتریک فوقانی، شاخه‌ای از شریان آئورت می‌باشد که روده کوچک و بخشی از روده بزرگ تا حد فاصل دو سوم سمت راست کولون عرضی را خونرسانی می‌کند. هرگونه انسداد در خونرسانی و برقراری مجدد جریان خون (ری‌پرفیوژن) به دنبال رفع انسداد، باعث ایجاد آسیب بافتی در روده می‌شود. حالات و بیماری‌های مختلف باعث ایجاد حالت ایسکمی-ری‌پرفیوژن در این شریان می‌شوند. از جمله این موارد می‌توان به فتق گیر افتاده اشاره کرد.

به منظور ایجاد انسداد در شریان مزانتریک فوقانی، ایسکمی-ری‌پرفیوژن بر روی شریان انجام گرفت.

آسیب ایسکمی-ری‌پرفیوژن، شامل یک توالی از حوادث شیمیایی است که به عملکرد بد سلولی و نکروز منتهی می‌شود و از دو بخش تشکیل شده است.

۱- آسیب مستقیم: آسیبی خفیف بوده و در طی مرحله ایسکمی ایجاد می‌شود. در این آسیب بافت و ارگان از خون محروم می‌شوند که در نتیجه مواد غذایی و اکسیژن ناکافی است.

۲- آسیب غیر مستقیم: در طی ری‌پرفیوژن ایجاد می‌شود و شامل آسیب بافتی است که بعد از مرحله ایسکمی بیشتر از ده دقیقه و برقرار شدن دوباره جریان خون بوجود می‌آید. این آسیب شدیدتر از آسیب ناشی از ایسکمی می‌باشد. بیشترین آسیب ناشی از ایسکمی-ری‌پرفیوژن، در مرحله ری‌پرفیوژن شکل می‌گیرد و رادیکال‌های آزادی که در اکسیژن دهی مجدد بافت ایسکمی شده آزاد می‌شوند، مسئول آسیب بافتی ایجاد شده هستند [۱، ۲].

آسیب القاء شده توسط ایسکمی-ری‌پرفیوژن، بوسیله تولید رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شود [۳].

رادیکال‌های آزاد، به ترکیبات یونی گفته می‌شوند که

1- Radical Oxygen Species

و بطن‌های مغزی می‌ریزد و از بطن‌ها، وارد مایع مغزی نخاعی می‌گردد.

ملاتونین عملکردهای متعددی دارد که از آن جمله می‌توان به درمان بی‌خوابی و به تأخیر انداختن فرایند پیری اشاره کرد [۷].

ملاتونین فعالیت‌های فیزیولوژیک متعددی از قبیل عملکرد نورواندوکرین و بلوغ جنسی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

علاوه بر آن، ملاتونین حاوی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشد که سلول‌ها و بافت‌ها و ارگان‌ها را از آسیب به وسیله گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) محافظت می‌کند.

همچنین ملاتونین رادیکال‌های آزاد را جمع‌آوری و از پراکسیداسیون چربی جلوگیری می‌نماید. سطوح مختلف

ملاتونین بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل SOD،

کاتالاز و گلوکاتایون را تحریک می‌کند و یا فعالیت آنها را افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ای مشخص شده که سطح

mRNA ایزوفرم‌های SOD مثل mn-SOD و Cu,Zn-SOD را تا ۵۱ - ۳۵٪ بعد از تجویز ملاتونین افزایش می‌دهد [۹].

ملاتونین به دو روش در کاهش رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند:

۱ - به روش مستقیم نسبت به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژن

۲ - به روش غیر مستقیم و از طریق عمل بر روی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بدن نسبت به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد از طریق این آنزیم‌ها اقدام می‌کند. [۱۰].

این رادیکال‌ها باعث آسیب اکسیداتیو می‌شوند که توانایی سلول را کاهش می‌دهد. همچنین رادیکال‌های آزاد باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شده که استفاده از داروهای آنتی‌اکسیدانی می‌تواند این ظرفیت را افزایش دهد [۱۱]. ملاتونین از طریق دادن الکترون، برای سم‌زدایی مستقیم رادیکال‌های آزادی مثل هیدروکسیل عمل می‌کند.

یون‌های کاتالیتیک متصل هستند، مشاهده می‌شود.

۳ - عملکرد دفاعی جمع‌کننده‌های رادیکال آزاد برای برداشت هیدروکسیل (OH⁻) از محل‌های ویژه، آسیب را کاهش می‌دهد. آرژنین - لیزین، سیستئین و پرولین به این نوع اکسیداسیون حساس هستند.

راه پیشگیری یا معالجه صدمه‌القاء شده توسط ایسکمی - ری‌پرفیوژن، به وسیله آنتی‌اکسیدان‌ها و پاک‌کننده‌های رادیکال آزاد و عوامل دیگر می‌باشد [۵، ۶].

ملاتونین، یک محصول مترشحه از غده پینه آل می‌باشد که بوسیله اثر بر روی هسته‌های سوپراکساماتیک، ریتم شبانه‌روزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و برای اولین بار توسط LERNER و همکارانش در سال ۱۹۵۸ کشف شد [۷].

ترکیب شیمیایی ملاتونین، N - استیل ۵ متوکسی تریپتامین^۱ یعنی مشتقی از سروتونین که از تریپتوفان ایجاد می‌شود می‌باشد.

سروتونین ابتدا به وسیله N - استیلوترانسفراز^۲ استیله می‌شود و سپس توسط هیدروکسی ایندول اورتومتیل ترانسفراز برای تشکیل ملاتونین، متیله می‌شود [۸].

قرار گرفتن در معرض نور، باعث مهار N - استیلوترانسفراز شده و تولید ملاتونین را متوقف می‌کند.

قرار گرفتن در معرض تاریکی باعث انتقال پیام عصبی توسط نورون‌ها به هسته‌های سوپراکساماتیک می‌شود. از آنجا پیام

عصبی به هسته‌های پارا و نتریکولار می‌رسد و از طریق عصب نخاعی توراسیک فوقانی به گانگلیون گردنی فوقانی می‌رود و به دنبال آن رشته‌های عصبی سمپاتیک به غده پینه آل رفته و

نوراپی نفرین ترشح می‌شود. نوراپی نفرین در پینالوسیت‌ها توسط گیرنده‌های α و β آدرنرژیک دریافت می‌شود و باعث افزایش تولید AMP حلقوی می‌شود و در مسیر سنتز ملاتونین باعث تبدیل سروتونین به ملاتونین می‌گردد. ملاتونین به خون

1- N-Acetyl-5 methoxy tryptamine
2- N-Acetyl o transferase

تزریق نمودیم.

گروه ۳: ایسکمی - ری پرفیوژن (I/R).

گروه ۴: I/R به همراه ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg

گروه ۵: I/R به همراه ملاتونین با دوز ۲۰ mg/kg

گروه ۶: I/R به همراه ملاتونین با دوز ۳۰ mg/kg

رت‌ها را قبل از شروع کار با ترازوی مخصوص وزن شده و برای بیهوشی با توجه به وزن آنها از کتامین ۱۰٪ و زیلازین ۲٪ (از شرکت Sigma) استفاده شد. کتامین با دوز ۴۰ - ۵۰ mg/kg و زیلازین با دوز ۴-۵ mg/kg به صورت داخل صفاقی (IP) به رت‌ها تزریق گردید.

رت را روی میز مخصوص عمل جراحی قرار داده و دست‌ها و پاها را با چسب در حالت اکستانسیون قرار داده و با محلول ضد عفونی کننده بتادین محل تراشیده شده ضد عفونی شد. سپس با استفاده از یک قیچی و پنس که قبلاً استریل شده بودند، پوست شکم رت در خط وسط از جناغ تا شانه به طوری که به صفاق آسیب وارد نشود، برش زده شد. سپس در طرفین با استفاده از یک قیچی نوک تیز پوست از صفاق جدا شد. در مرحله بعد با استفاده از قیچی و پنس صفاق نیز در خط وسط و در همان مسیر برش پوست باز شد تا محتویات شکم مشخص شود. سپس با استفاده از یک اکارتور، شکم کاملاً باز گردید.

با استفاده از دو پنس استریل روده‌ها به آرامی به سمت چپ کنار زده و در خط وسط و متمایل به چپ، شریان شریان آئورت مشاهده شد. شریان مزانتریک فوقانی باید در بخش فوقانی شکم در سمت چپ هنگامی که از آئورت جدا شده و وارد مزانتز روده می‌شود پیدا کرد. ورید مزانتریک فوقانی نیز هم مسیر شریان و در سمت چپ شریان قابل رویت است.

طول شریان کوتاه و در حدود ۱ سانتی متر می‌باشد که در زیر صفاق خلف شکم قرار گرفته است. شریان با استفاده

ملاتونین از سلول، بافت و ارگان ضد آسیب اکسیداتیوی که به وسیله فرایندها و عوامل مختلف تولید رادیکال آزاد القاء می‌شود، محافظت می‌کند. ملاتونین در محافظت DNA هسته، چربی‌های غشا و پروتئین‌های سیتوپلاسم موثر بوده و ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی کل ارگانیزم را بهبود می‌بخشد. عملکرد ملاتونین به عنوان جمع کننده رادیکال آزاد و آنتی اکسیدان احتمالاً مربوط به عبور آسان آن از سد های بدن مثل سد خونی - مغزی (BBB) و وارد شدن آن به سلول و اندامک‌های سلولی می‌باشد [۱۲]. بدین ترتیب در مطالعه حاضر و با توجه به عملکرد ملاتونین، این ماده به عنوان یک آنتی اکسیدان و جمع کننده رادیکال‌های آزاد به دنبال ایسکمی - ری پرفیوژن مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش بررسی

مطالعه روی ۳۶ سر رت نر از نژاد Wistar-Albino خریداری شده از انستیتو پاستور با وزن ۱۲۰ - ۸۰ گرم انجام گرفت. رت‌ها در قفس‌های جداگانه و در دمای ۲۵ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت بین ۸۰ - ۷۰ درصد قرار داده و به مدت ۱۲ ساعت در معرض نور قرار گرفته و با غذای استاندارد رت تغذیه شدند. ۱۲ ساعت قبل از آزمایش به آنها غذا داده نشد اما آب مصرف می‌کردند. بعد از اتمام کار، بدون هیچ محدودیتی غذا و آب در اختیار رت‌ها قرار گرفت. تمام روش‌های مطالعه بر روی حیوانات مطابق با قوانین NIH بود. ۳۶ سر رت را به شش گروه ۶ تایی به ترتیب زیر دسته‌بندی نمودیم:

گروه ۱: کنترل

گروه ۲: sham که عمل جراحی را تا تشریح شریان مزانتریک فوقانی انجام داده و حجم یکسانی از حلال‌ها را

سانتی‌گراد و در جای تاریک و دور از نور نگهداری شود. برای استفاده از ملاتونین، باید به روش زیر و در شرایط استریل حل شود:

۴۸ میلی‌گرم ملاتونین در ۱ سی‌سی اتانول خالص حل شده و برای کاهش اثر و خاصیت سمیت اتانول، بوسیله نرمال سالین ۰/۹٪ (N/S) به نسبت ۱:۱۰ رقیق گردید.

ملان دی آلدئید (MDA)، یکی از محصولات ناشی از پراکسیداسیون چربی توسط رادیکال‌های آزاد و به عنوان یک محصول مضر و خطرناک برای بافت می‌باشد. در این مطالعه برای بررسی اثر مفید ملاتونین برای حذف رادیکال‌های آزاد و کاهش پراکسیداسیون چربی متعاقب آن، این فاکتور اندازه‌گیری شد.

با استفاده از روش تیوباربتوریک اسید [۱۳]. می‌توان آلدئیدهای حاصله از پراکسیداسیون بافتی را اندازه‌گیری نمود. در این روش آلدئیدهای حاصله از پراکسیداسیون پپتیدی که با TBARS نمایش داده می‌شوند (اکثراً MDA)، با تیو باربتوریک اسید در PH اسیدی و دمای بالا واکنش داده و ایجاد یک کمپلکس رنگی می‌کند که دارای قابلیت جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر (nm) می‌باشد.

پروتئین، یکی از اجزاء مهم سلول و غشاء سلولی است که رادیکال‌های آزاد باعث از بین رفتن آنها می‌شوند و میزان آن را در بافت کاهش می‌دهند. در این مطالعه به بررسی اثر ملاتونین به عنوان یک جمع‌کننده رادیکال‌های آزاد و کاهش تخریب پروتئین سلولی متعاقب آن پرداخته می‌شود.

با استفاده از کیت پروتئین ادرار شرکت شمیم آنزیم، غلظت پروتئین اندازه‌گیری گردید. اساس آزمایش در این کیت بر واکنش Pyrogallal red با پروتئین در مجاورت با مولیبیات و شرایط اسیدی می‌باشد، که کمپلکس رنگی ایجاد شده در طول موج ۶۰۰ نانومتر (nm) دارای بیشترین جذب است.

از یک پنس از خلف صفاق جدا شده و آزاد گردید. برای بستن شریان از کلمپ‌های کوچک مخصوص عمل‌های جراحی مغز و اعصاب و آنوریسیم استفاده شد. نبض جریان خون بعد از کلمپ کردن شریان در پشت کلمپ و ابتدای شریان مشاهده شد و همچنین قطع جریان خون در شاخه‌های جدا شده از مزانتریک فوقانی، در مزانتر روده دیده شد. شریان مزانتریک فوقانی برای مدت ۳۰ دقیقه در حالت کلمپ باقی ماند.

در این مدت برای این که روده‌ها در معرض هوا خشک نشوند و برای جلوگیری از چسبندگی آنها، یک گاز استریل را که با نرمال سالین ۰/۹٪ استریل مرطوب شده بود، روی شکم باز شده رت قرار داده شد تا رطوبت محل حفظ شود. درحین عمل بطور مرتب ضربان قلب و تنفس رت بررسی شد و با استفاده از یک چراغ حرارتی از کاهش درجه حرارت بدن رت جلوگیری گردید. بعد از اتمام ۳۰ دقیقه، کلمپ به آرامی با استفاده از اپلیکاتور از روی شریان برداشته و در این حال بازگشت مجدد جریان خون به روده کاملاً مشاهده شد. ملاتونین آماده شده برای رت‌ها را به صورت داخل عضلانی قبل از برداشتن کلمپ و بعد از برداشتن آن تزریق گردید. در مرحله بعد روده‌ها به آرامی در سر جای خودشان قرار داده و اکارتور برداشته و با استفاده از نخ سیلک ۰-۴، صفاق و پوست به همراه هم ترمیم گردید. محل بخیه را با استفاده از بتادین ضد عفونی کرده و رت‌ها به قفس مخصوص خودشان انتقال یافتند.

دوز سوم دارو در فردای روز عمل به صورت داخل عضلانی (IM) به رت‌ها تزریق شد. در روز سوم رت‌ها را با استفاده از دوز بالای کتامین کشته و متغیرهای مورد نظر اندازه‌گیری شدند.

داروی ملاتونین ($O_{13}H_{16}N_2O_2$) مورد نیاز برای انجام این کار، از شرکت Sigma آمریکا تهیه شد. این دارو به صورت پودر شیری رنگ در ویال‌های تیره رنگ ۱۰۰ mg قرار دارد. پودر ملاتونین باید در دمای ۲۰- درجه

از پراکسیداسیون لیپیدی و بررسی اثر ملاتونین بر روی این شاخص نشان داده که میزان MDA بافتی در گروه ایسکمی - ری‌پرفیوژن (I/R) در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری ($P < 0/01$) افزایش یافته بود. میزان MDA بافتی در گروه‌های تحت درمان با ملاتونین با دوز ۱۰، ۲۰، ۳۰ mg/kg نسبت به گروه I/R به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کاهش یافته بود (جدول ۱).

به منظور بررسی نتایج آزمایش‌های صورت گرفته در این مطالعه برای متغیرهای ملان دی آلدئید (MDA) و پروتئین بافتی، از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA و t-test استفاده شد و اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف را بوسیله تست Tukey بررسی شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه، داده‌های بدست آمده از ملان دی آلدئید بافتی (MDA) به عنوان شاخصی

mg/kg ملاتونین			میزان		
۳۰	۲۰	۱۰	I/R	Sham	کنترل
*۱/۶۸۶	*۱/۴۱۹	*۱/۳۱۴	††۲/۵۸۰	۱/۳۵۳	۰/۸۱۷۸
۰/۱۴۴۷	۰/۰۷۰۶۰	۰/۲۶۳۹	۰/۳۲۰۳	۰/۳۵۷۰	۰/۲۸۱۸
			MDA(μg/μl) (Mean±SE) Mean		
			SE		

* اختلاف معنی‌دار با گروه I/R دارد ($P < 0/05$).

††† اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دارد ($P < 0/01$).

تحت درمان با ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg نسبت به گروه I/R به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود ($P < 0/001$). بین میزان پروتئین بافتی در گروه‌های تحت درمان با ملاتونین با روزهای ۲۰ - ۳۰ mg/kg در مقایسه با گروه I/R اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$) (جدول ۲).

با نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، داده‌های بدست آمده از بررسی پروتئین بافتی در روده نشان داد که میزان پروتئین بافتی در گروه I/R در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0/001$). بین گروه Sham و کنترل اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$). میزان پروتئین بافتی در گروه

mg/kg ملاتونین			میزان		
۳۰	۲۰	۱۰	I/R	Sham	کنترل
۵/۳۶۵	۶/۸۵۳	۱۵/۳۲۴***	†††۴/۳۹۰	۱۲/۸۳۳	۱۵/۳۳۳
۱/۱۷۶	۱/۰۹۷	۲/۹۶۹	۰/۸۴۸۲	۳/۰۴۰	۱/۵۵۴
			(mg/dl) Mean		
			± SE		

*** : اختلاف معنی‌دار با گروه I/R دارد ($P < 0/001$).

††† اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دارد ($P < 0/001$).

بحث

نوتروفیل‌ها، باعث پراکسیداسیون چربی و اکسیداسیون پروتئین غشاء سلول می‌شوند [۲۲].

مطالعه ای توسط Masuko و همکارانش در سال ۱۹۹۹، نشان داد که استفاده از مهار کننده های گزانتین اکسیداز (XO) از قبیل آلپورینول یا اکسی پورینول، آسیب ناشی از I/R را کاهش می‌دهند [۲۳].

همچنین تحقیقات انجام شده توسط Hansen و همکارانش در سال ۱۹۹۵ و Kazez و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان داد که برداشت لکوسیت‌ها از سیستم گردش خون تا حد زیادی آسیب ناشی از I/R را کاهش می‌دهد [۲۴، ۲۵].

Bartlett عنوان کرد که آسیب ناشی از فاز ری پرفیوژن به علت مقادیر زیادی رادیکال آزاد، بسیار شدیدتر از فاز ایسکمی است [۲]. اما لزوم برقراری ری پرفیوژن برای نگهداری بافت ایسکمی قابل انکار نیست، چون از این طریق انرژی سلولی تأمین می‌شود و متابولیت‌های سمی برداشته می‌شوند [۲۵].

ملاتونین به عنوان یک محصول مترشح از غده پینه آل می‌باشد که عملکردهای مختلفی از جمله خاصیت آنتی اکسیدانی دارد [۷]. ملاتونین یا به روش مستقیم رادیکال‌های آزاد را جمع‌آوری کرده و یا به روش غیرمستقیم و از طریق افزایش قدرت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بدن نسبت به جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد اقدام می‌کند [۱۰].

ملاتونین در محافظت DNA هسته و چربی‌های غشاء و پروتئین‌های سیتوپلاسمی مؤثر بوده و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ارگانیزم را بهبود می‌بخشد. عملکرد ملاتونین به عنوان جمع‌کننده رادیکال آزاد و آنتی اکسیدان احتمالاً مربوط به عبور آسان ملاتونین از سد های بدن مثل سد خونی - مغزی (BBB) و وارد شدن آن به سلول و اندامک‌های سلولی می‌باشد [۱۲].

پراکسیداسیون چربی یکی از آسیب‌های ناشی از رادیکال

مطالعات انجام شده توسط Galat و همکارانش در سال ۱۹۹۰ و Wang و همکارانش در سال ۲۰۰۳، Ozkan و همکارانش در سال ۲۰۰۴ و Hauet و همکارانش در سال ۱۹۹۸، نشان دادند که رادیکال‌های آزاد در پاتوژنز آسیب القایی در I/R نقش دارند [۱۷-۱۴].

همچنین مطالعات متعدد انجام شده توسط Freeman در سال ۱۹۸۲، Mc Cord در سال ۱۹۸۵، Bhaskar در سال ۱۹۹۵ و Sievert در سال ۲۰۰۳، نشان دادند که سیستم گزانتین اکسیداز و نوتروفیل‌های فعال شده، در تولید رادیکال‌های آزاد سمی و ایجاد آسیب در طی I/R نقش دارند [۲۱-۱۸].

در فاز ایسکمی سیستم گزانتین اکسیداز، قطع جریان خون و کمبود اکسیژن منجر به متابولیسم غیرهوازی و کمبود انرژی و کاهش ATP و تجمع هیپوگزانتین در سلول‌های ایسکمی شده می‌شود. نبود انرژی، پمپ یونی ATPase غشاء سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و منجر به تجمع کلسیم و سدیم و آب در سلول و تورم آن می‌شود.

گزانتین دی هیدروژناز که یک آنزیم طبیعی بدن است، به گزانتین اکسیداز تبدیل می‌شود (بوسیله پروتئاز وابسته به کلسیم) [۲۰].

در فاز ری پرفیوژن، گزانتین اکسیداز، هیپوگزانتین را به گزانتین تبدیل می‌کند و همچنین تولید اسید اوریک، رادیکال‌های سوپر اکسید (O_2^-) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) می‌کند. این وضعیت منجر به پراکسیداسیون چربی و اکسید شدن پروتئین غشاء سلول می‌شود.

از سوی دیگر، نوتروفیل‌ها در طی ری پرفیوژن فعال شده و به بافت همبند مهاجرت می‌کنند. اکسیداسیون در نوتروفیل‌ها در طی ری پرفیوژن منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. این ترشحات خارج سلولی سمی

رادیکال آزاد ناشی از ایسکمی - ری پرفیوژن باعث اکسیداسیون پروتئین می‌شود و میزان آن در گروه ایسکمی - ری پرفیوژن نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته، مطابقت دارد [۲۲].

مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۳ توسط Recio و همکارانش نشان داد که ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg، اکسیداسیون پروتئین ناشی از آدیومایسین را کاهش می‌دهد. تحقیق ما نیز نشان داد که تجویز ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg، می‌تواند اکسیداسیون پروتئین را به طور معنی داری نسبت به گروه ایسکمی - ری پرفیوژن کاهش دهد [۳۰].

ملاتونین با دوز ۲۰-۳۰ mg/kg، تغییر معنی داری را در اکسیداسیون پروتئین نسبت به گروه ایسکمی - ری پرفیوژن نشان نداد.

مطالعه فوق نشان داد که انسداد شریان مزانتریک فوقانی به دنبال ایسکمی - ری پرفیوژن، باعث ایجاد آسیب به چربی و پروتئین بافتی می‌شود. تجویز ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg به طور معنی داری منجر به کاهش میزان MDA و افزایش پروتئین بافتی می‌گردد.

تجویز ملاتونین با دوز ۲۰ mg/kg تغییر معنی داری در میزان MDA بافتی بوجود آورد اما تغییر معنی داری در میزان پروتئین ایجاد نکرد. تجویز ملاتونین در دوز ۳۰ mg/kg، به طور معنی دار میزان MDA بافتی را کاهش داد ولی تغییر معنی داری در میزان پروتئین بوجود نیاورد.

آزاد است. برای اندازه‌گیری پراکسیداسیون چربی از شاخص MDA استفاده شد. MDA محصول نهایی پراکسیداسیون چربی می‌باشد.

در مطالعه ما مشخص شد که ملاتونین با دوز ۱۰ mg/kg، میزان MDA بافتی را به طور معنی داری کاهش داده است. این یافته با مطالعات انجام شده توسط Sener، Atilla و همکارانشان و Ozturk و همکارانش در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد [۲۸-۲۶]. تجویز ملاتونین با دوز ۲۰ mg/kg، تغییر معنی داری در میزان MDA ایجاد کرد، که این یافته با مطالعات انجام شده توسط Kazaz و Ozturk در سال ۲۰۰۰-۲۰۰۳ و Singh و همکارانش در سال ۲۰۰۲ مطابقت داشت [۲۵، ۲۸، ۲۹]. تجویز ملاتونین با دوز ۳۰ mg/kg، تغییر معنی داری در میزان MDA بوجود آورد.

این یافته‌ها نشان داد که تجویز ملاتونین با دوز ۳۰ mg/kg و ۲۰ و ۱۰ می‌تواند میزان MDA را کاهش دهد و از آسیب ایسکمی - ری پرفیوژن بکاهد. آسیب به پروتئین یکی از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد در طی ایسکمی - ری پرفیوژن می‌باشد. این آسیب به دو صورت Global و Localized در پروتئین ایجاد می‌گردد. مطالعه انجام شده توسط Kahraman و همکارانش در سال ۲۰۰۳، نشان داد که رادیکال آزاد باعث اکسیداسیون پروتئین می‌شود، این یافته با مطالعه ما که نشان داد

References

1. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust NZJ Surg* 1998; 68: 554-61.
2. Bartlett RL. Leukocyte mediated reperfusion injury: What role HBO? Richard Hyperbaric Health Center [serial on line] 1996 [cited 2006 sep26]; [www.richmond-hyperbaric.com/RHHC.Reperfusion.htm]
3. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-72.
4. Schlondroff D, Ardaillou R. Prostaglans other arachidonic acid metabolites in the kidney. *Kidney Int* 1986; 29: 108-119.
5. Sinatra ST, De Macro J. Free radicals, Oxidative stress, Oxidized low density lipoprotein (LDL) and the heart: antioxidants and other strategies to limit cardiovascular damage. *Conn Med* 1995; 59: 579-88.
6. Haramaki N, Stewart DB, Aggarwal S. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by Ischemia-reperfusion. *Free Radi Biol Med* 1998; 25: 329-339.
7. K. Hempel: Melatonin. *The health gazette* 1996; 2
8. Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: A Review of the science. *Med scape General Medicine* 2004; 6: 1-14.
9. Reiter JR, Tan DX, Exuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444-458.
10. Reiter RJ, Tan D, Mayo JC, Sainz RM, Leon L, Czarnocki Z. Melatonin as antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochemica Polonica* 2003; 50: 1129-1146.
11. Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ, Tricaud Y, Martin M, Holfschir D, et al. Radiation induced cutaneo-muscular fibrosis (III): major therapeutic efficacy of liposomal Cu/Zn superoxide dismutase. *Bull Cancer* 1993; 80: 799-807.
12. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255-2271.
13. Esterbauer H, Cheesman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products. Malonaldehyde and 4-hydroxy nonenal. *Meth Enzymol* 1990; 186: 407-421.
14. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS. Postischemic renal dysfunction: the limited role of xanthine oxidase-generated oxygen free radicals. *J Surg Res* 1990; 49: 488-492.
15. Wang J, Huang YW, Wei JH, Wei TX, Dong JZ, Zhang JY. Protective effect of trimetazidine on rabbit myocardium during ischemia-reperfusion. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2003; 32: 219-22.
16. Ozkan KU, Boran C, Killinc M, Garipardic M, Kurutas EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 91-5.
17. Hauet T, Baumert H, Mothes D, Germonvill T. Lipid peroxidation after cold storage and normothermic reperfusion: the effect of trimetazidine. *Transpl Int* 1998; 11: 408-409.
18. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
19. Mc Cord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* 1985; 312: 159-163.
20. Bhaskar L, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical-induced damage during colonic ischemia reperfusion in rats. *Mol Cell Biochem* 1995; 151: 9-14.
21. Sievert A. Leukocyte depletion as a mechanism for reducing neutrophil-mediated ischemic-reperfusion injury during transplantation. *Jextra Corpor Technol* 2003; 35: 48-52.
22. Kahraman A, Erkasap N, Serteser M, Koken T. Protective effect of quercetin on renal

- ischemia/reperfusion injury in rats. *J nephrol* 2003; 16: 219-224.
23. Masuko T, Sasaki L, Funayama Y, Naito H. Direct measurement of phosphatidylcholine hydroperoxide discloses the mechanism of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *The society for surgery of the alimentary tract* 1999; 4: 5.
24. Hansen PR. Role of Neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91: 1872-1885.
25. Kazez A, Demirba M, Ustunda B, Ozercan BH. The role of melatonin in prevention of intestinal ischemia – reperfusion injury in rats. *J Pediatric Surgery* 2000; 35: 1444–1448.
26. Sener G, Sehirli AO, Keyer Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yegen BC. The protective effect of melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Pineal Res* 2002; 32: 120-6.
27. Atilla S, Rahmi O, Sezai O, Irfon O. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuroendocrinology letters* 2003; 24: 86-90.
28. Ozturk A, Baltaci A, Mogulkoc R, Ozturk B. The effect of prophylactic melatonin administration on reperfusion damage in experimental testis ischemia-reperfusion. *Neuroendocrinology letters* 2003; 24: 170-2.
29. Singh P, Bhargava VK, Garg SK. Effect of melatonin and beta – carotene on indomethacin induced gastric mucosal injury. *Indian J Physiol Pharmacol* 2002; 46: 229–34.
30. Recio Pascual J M: Current view of the pineal gland. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina* 2003; 120: 337–51.

Lipid peroxidation following superior mesenteric artery occlusion in rat intestine

S. Saeednia¹
P. Pasbakhsh^{1*}
F. Abolhasani¹
M. Noori¹
M. Ghazi Khansari¹
K. Mehran nia¹

1. Department of Anatomy
School of Medicine Tehran
University of medical sciences,
Tehran, Iran.

Abstract

Background: The aim of this study was to determine the level of lipid peroxidation and tissue protein after superior mesenteric artery occlusion tissue damage. The effect of melatonin as anti oxidant and free radical scavenger in prevention of tissue damage, were also evaluated.

Methods: Thirty six young male Wistar-Albino rats (weight: 80-120 gr), were divided equally in 6 groups with different concentrations of melatonin (10,20,30 mg/kg) treatment. Group 1 was control, group 2 the sham that surgical process was applied until superior mesenteric artery dissection and received vehicle solution only in equally volume by intra muscular route. Group 3 was ischemia- reperfusion (I/R), group 4 was I/R plus melatonin 10 mg/kg, group 5 I/R plus melatonin 20 mg/kg and finally group 6 I/R plus melatonin 30 mg/kg. After laparotomy, a microvascular atraumatic clip was placed across the superior mesenteric artery under general anaesthesia and it was removed after ischemia for 30 minutes. The first dose of melatonin was applied just before reperfusion, second dose, after reperfusion and third dose on the second day. On third day rats were killed and their bowels were removed. The level of tissue malondialdehyde (MDA) as index of lipid peroxidation and tissue protein was determined.

Results: The level of tissue MDA were significantly lower in group 4, 5, 6 than group 3 ($p < 0.05$). Tissue protein levels were significantly higher in group 4 than group 3. ($p < 0.001$). There was no significant difference tissue protein level in group 5, 6 than group 3 ($p > 0.05$).

Conclusion: These results suggest that melatonin 10 mg/kg has antioxidant effect in prevention of inducing tissue damage during SMA occlusion in rat intestine.

Keywords: Lipid peroxidation, superior mesenteric artery, melatonin, antioxidant, ischemia - reperfusion.

* Tehran University of Medical Sciences,
Tehran, Tel: +98(21) 44619072,
E-mail: pasbakhsh@hotmail.com