

بررسی شاخص‌های متابولسمی و استرس اکسیداتیو در نفروپاتی ناشی از انسداد حاد یکطرفه میزنای در رت

چکیده

سعید چنگیزی آشتیانی^۱

سید مصطفی شید موسوی^{*۱}

سامان حسینیانی^۲

مهدی شیرازی^۳

۱- گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

۲- گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس

۳- گروه اورولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

*نویسنده مسئول: شیراز، خیابان زند، دانشکده پزشکی،

طبقه ششم، گروه فیزیولوژی تلفن: ۰۷۱۱-۲۳۰۲۰۲۶

email: mmoosavi@sums.ac.ir

مقدمه

بیماری‌های انسدادی کلیوی به بیماری‌هایی اطلاق می‌شود که ناشی از تضعیف جریان ادراری به علت ایجاد مقاومت در مقابل آن در هر نقطه از طول مسیر ادراری باشد. مقاومت در برابر جریان ادرار سبب افزایش فشار بازگشتی می‌شود که فشار مستقیمی را به پارانشیم کلیه وارد می‌کند. آسیب اصلی به بافت کلیه ناشی از این افزایش فشار مستقیم است که بلافاصله بعد از شروع انسداد رخ می‌دهد. بنابراین آسیب در نفروپاتی انسدادی توسط شرایطی که به صورت حاد فشار میزنا را افزایش می‌دهند، نظیر افزایش در جریان ادرار یا افزایش میزان انسداد یا هر دو تشدید می‌گردد.^۱ بیماری‌های انسدادی کلیه بر اساس مدت، درجه و محل انسداد تقسیم‌بندی می‌شوند. اصطلاح حاد

زمینه و هدف: انسداد میزنا با توقف جریان ادرار و افزایش فشار در بخش‌های بالایی مجاری ادراری سبب تضعیف پیشرونده در عملکرد کلیوی می‌شود. این مطالعه برای ارزیابی شرایط استرس اکسیداتیو و تغییرات متابولسمی در بافت کلیوی طی انسداد حاد یکطرفه میزنا طراحی شده است. روش بررسی: در رت‌های نر نژاد اسپراگ-دالی (n=10) در هر گروه، میزنا چپ به صورت استریل و تحت بیهوشی مسدود گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از انسداد یکطرفه میزنا، هر دو کلیه برداشته و در 70°C - حفظ شدند. در رت‌های گروه‌های شاهد و کنترل نیز کلیه‌ها خارج و ذخیره گردید. برای تعیین وضعیت متابولسم، سطوح ATP و ADP، و برای ارزیابی وضعیت استرس اکسیداتیو، سطوح مالون دی آلدئید (MDA) و توانایی آنتی اکسیدانی / احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (FRAP)، در بافت کلیوی ارزیابی شد. یافته‌ها: مقایسه بین گروه دارای انسداد میزنا و گروه شاهد نشان داد که ۲۴ ساعت انسداد حاد یکطرفه میزنا سبب افزایش میزان‌های MDA ($51/42 \pm 1/86$ nmol/gKW در مقابل $38/64 \pm 1/02$ با $p < 0/001$) و ADP ($0/678 \pm 0/44$ $\mu\text{mol/gKW}$ در مقابل $0/474 \pm 0/04$ با $p < 0/05$)، اما کاهش (همگی با $p < 0/001$) مقادیر FRAP ($2/44 \pm 0/16$ $\mu\text{mol/gKW}$ در مقابل $4/28 \pm 0/27$)، ATP ($1/09 \pm 0/10$ $\mu\text{mol/gKW}$ در مقابل $2/26 \pm 0/19$)، و ATP/ADP ($5/11 \pm 0/56$ در مقابل $1/64 \pm 0/149$) در کلیه انسدادی شد. درحالی‌که در کلیه غیر انسدادی مقادیر ATP و ADP افزایش و ATP/ADP و MDA عدم اختلاف نسبت به کلیه معادل در گروه شاهد داشتند. نتیجه‌گیری: ۲۴ ساعت انسداد یکطرفه میزنا سبب القاء شرایط استرس اکسیداتیو و کاهش متابولسم هوازی در کلیه انسدادی، به همراه یک افزایش جبرانی متابولسم و بدون بروز استرس اکسیداتیو در کلیه غیر انسدادی می‌گردد.

کلمات کلیدی: کلیه، انسداد حاد یکطرفه میزنا، استرس اکسیداتیو، متابولسم کلیوی، ATP، ADP.

به موارد انسداد کوتاه مدت (کمتر از ۴۸ ساعت)، اطلاق می‌گردد و چنانچه انسداد به آرامی و در درازمدت توسعه یابد مزمن نامیده می‌شود. همچنین انسداد ممکن است یکطرفه و یا دو طرفه باشد. اثرات بیماری‌های انسدادی بر روی کلیه ناشی از تنوعی از فاکتورها و برهم‌کنش پیچیده‌ای از آنها است که هم همودینامیک و هم عملکرد توپول‌ها را تحت تاثیر خود قرار می‌دهند.^۲ گونه‌های فعال اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) که شامل رادیکال آزاد سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال آزاد هیدروکسیل (OH)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و اکسیژن منفرد (O_2^{\cdot}) هستند، به نظر می‌رسد که به عنوان میانجی‌های مهمی در چندین مدل آسیب بافتی دخالت داشته باشند.^۳ مطالعات فراوانی وجود دارند که حکایت از افزایش تولید ROS همراه با

تضعیف دفاع آنتی اکسیدانی در فرم مزمن انسداد میزنا می‌نماید، ولی در خصوص تغییرات ROS در شرایط حاد انسداد میزنا اطلاعات چندانی وجود ندارد. از آنجایی که نقش غیرقابل انکاری برای ROS در پاتوفیزیولوژی بسیاری از انواع نارسایی حاد کلیوی ایسکمیک یا توکسیک گزارش شده است، بنابراین ROS ممکن است در برخی تغییرات عملکردی و آسیب‌های مرفولوژیک مشاهده شده در کلیه طی انسداد حاد میزنا نیز دخیل باشد.^۴ مطالعات عملکرد متابولیسم کلیه در طی انسداد حاد میزنا نشان‌دهنده کاهش برجسته مصرف اکسیژن توام با کاهش تولید دی اکسیدکربن و همراه با افزایش در نسبت تنفسی است، که پیشنهاد کننده یک شیفت به گلیکولیز بیهواری می‌باشد. در حقیقت گلیکولیز بیهواری ممکن است بسته به مدت انسداد حتی تا ده برابر افزایش یابد و چنین اختلالاتی ممکن است حتی بعد از رفع انسداد نیز ادامه یابد.^۵ در ارتباط با تغییرات در سطح ATP و ADP طی انسداد ۲۴ ساعته میزنا گزارشات متناقضی وجود دارد. Nito و همکاران یک کاهش توام در سطح ATP و ADP را در طی ۲۴ ساعت انسداد یکطرفه میزنا در رت نشان داده‌اند،^۶ درحالی که Kurokawa و همکاران یک کاهش در سطح ATP همراه با افزایش در ADP را در شرایط مشابه خاطر نشان می‌کنند.^۷ این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی توام وضعیت استرس اکسیداتیو و عملکرد متابولیسمی در انسداد حاد یکطرفه میزنا (Unilateral Ureteral Obstruction (UUO) در بافت کلیه انسدادی و غیر انسدادی و در جهت شناخت بهتر عوامل مسئول ایجاد آسیب کلیوی در طی UUO طراحی شده است.

روش بررسی

آزمایشات بر روی ۳۰ رأس رت نر نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۵۰ گرم، تهیه شده از مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز، و در سه گروه ده‌تایی صورت پذیرفت. رت‌ها در قفس‌های جداگانه در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در محدوده حرارتی 23 ± 2 درجه سانتیگراد و دسترسی به مقادیر دلخواه آب و غذا نگهداری می‌شدند. جهت ایجاد انسداد یکطرفه میزنا در گروه UUO، حیوانات در ابتدا با اثر به‌طور سبکی بیهوش شده و سپس یک برش کوچک در ناحیه سوپراپوبیک چپ ایجاد می‌گردید. میزنا چپ در یک سوم بخش دیستال در دو

نقطه با نخ ۴ صفر سیلک مسدود و سپس ناحیه برش زده شده بخیه می‌شد. در گروه Sham (شاهد) تمامی مراحل جراحی جهت مسدود کردن میزنا چپ انجام می‌شد ولی میزنا مسدود نمی‌گردید. کلیه مراحل جراحی به‌صورت استریل انجام می‌پذیرفت و به‌منظور جلوگیری از بروز عفونت ۴۰/۰۰۰ واحد پروکائین پنی سیلین و ۵۰ میلی‌گرم استرپتومایسین به‌صورت داخل عضلانی بعد از اتمام جراحی به حیوانات تزریق می‌گردید.^۸ حیوانات جهت ریکاوری به قفس باز گردانده شده و در اختیارشان آب و غذا قرار می‌گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از انسداد در گروه UUO یا معادل انسداد در گروه Sham و همچنین در رت‌های گروه کنترل، که اصلاً تحت جراحی قرار نگرفته بودند، متعاقب بیهوش کردن حیوانات با اتر با استفاده از کوتر یک برش طولی در ناحیه شکم ایجاد می‌شد و کلیه‌ها سریعاً از بدن حیوان خارج و در روی یخ خشک به دو نیمه تقسیم می‌شدند و پس از منجمد شدن در ازلت مایع در فریزر 70°C - ذخیره می‌گردیدند. برای تعیین میزان ROS 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.^۹ به‌طور خلاصه، ابتدا بعد از خارج کردن بافت کلیوی از فریزر و توزین آن، بافر فسفات‌بی به نسبت یک به ده (W/V) اضافه شده و سپس با کمک هموژنایزر یک محلول همگن تهیه می‌گردید. اسید سولفوریک و تیوباربتوریک اسید به این محلول همگن اضافه می‌شد تا واکنش MDA با تیوباربتوریک اسید در دمای $100-95^{\circ}\text{C}$ و در $\text{pH} = 3/5$ انجام گردد. بعد از تشکیل یک کمپلکس صورتی رنگ و استخراج آن با آن- بوتانول، جذب در 532 nm با کمک دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین و با منحنی استاندارد حاصل از ترامتوکسی پروپان مقایسه و مقدار عددی بر حسب nmol/gKW گزارش می‌گردید. اندازه‌گیری FRAP از سال ۱۹۹۶ یکی از رایج‌ترین روشهای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام محسوب می‌شود که به‌واسطه سادگی، حساسیت و ارزانی به‌سرعت جایگاه خود را در بین محققین پیدا کرده است. این روش بر اساس توانایی مایعات بافتی در احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) در حضور ماده‌ای به‌نام TPTZ (Tripyridyl-S-Triazine) استوار است. میزان قدرت احیاکنندگی مایعات بافتی از طریق افزایش میزان غلظت کمپلکس TPTZ-Fe^{2+} آبی رنگ توسط دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری

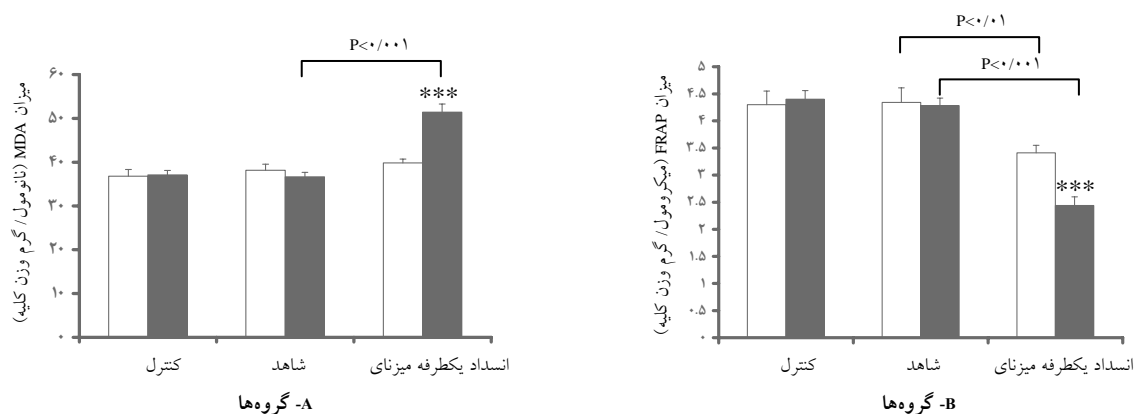
اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. درحالی‌که در گروه UUO، ۲۴ ساعت انسداد یکطرفه میزناهی باعث افزایش سطح MDA در کلیه انسدادی نسبت به کلیه غیر انسدادی ($51/42 \pm 1/86$ nmol/gKW) در مقابل $39/84 \pm 0/85$ ($p < 0/001$)، و همچنین نسبت به کلیه چپ در گروه شاهد ($p < 0/001$) گردید. کاهش سطح FRAP بافت کلیه بر اثر انسداد حاد میزناهی: در نمودار ۱B مشخص می‌باشد که مقادیر FRAP کلیه‌های راست و چپ در گروه کنترل (به ترتیب $4/30 \pm 0/25$ و $4/40 \pm 0/16$ $\mu\text{mol/gKW}$) با یکدیگر و با مقادیر آنها در گروه شاهد (به ترتیب $4/34 \pm 0/22$ و $4/28 \pm 0/27$ $\mu\text{mol/gKW}$) از لحاظ آماری برابر می‌باشند. در گروه UUO، سطوح FRAP هم در کلیه راست ($3/41 \pm 0/15$ $\mu\text{mol/gKW}$) و هم در کلیه چپ ($2/44 \pm 0/16$ $\mu\text{mol/gKW}$) در مقایسه با کلیه‌های مشابه در حیوانات گروه شاهد کاهش یافتند. به‌علاوه در این گروه میزان FRAP کلیه انسدادی از کلیه غیر انسدادی پایین‌تر ($p < 0/001$) بود.

کاهش سطح متابولیسم هوازی کلیه بر اثر انسداد حاد میزناهی: سطوح ATP (نمودار ۲A) در کلیه‌های راست و چپ برای گروه کنترل به ترتیب $2/14 \pm 0/24$ و $2/20 \pm 0/17$ $\mu\text{mol/gKW}$ و برای گروه شاهد به ترتیب $1/99 \pm 0/14$ و $2/26 \pm 0/19$ $\mu\text{mol/gKW}$ بود، که هیچکدام با یکدیگر از لحاظ آماری اختلاف نداشتند. ۲۴ ساعت انسداد حاد میزناهی سبب کاهش در سطح ATP کلیه انسدادی ($1/10 \pm 0/10$ $\mu\text{mol/gKW}$) و افزایش در کلیه مقابل ($2/91 \pm 0/16$ $\mu\text{mol/gKW}$) در مقایسه با کلیه‌های مشابه در گروه شاهد شد. به‌علاوه در گروه UUO، سطوح ATP کلیه‌های انسدادی و غیر انسدادی با یکدیگر متفاوت ($p < 0/001$) بودند. نمودار ۲B نشان می‌دهد که سطوح ADP کلیه‌های راست و چپ در گروه کنترل (به ترتیب $0/48 \pm 0/04$ و $0/48 \pm 0/04$ $\mu\text{mol/gKW}$) با یکدیگر و با مقادیر آنها در گروه شاهد (به ترتیب $0/45 \pm 0/04$ و $0/45 \pm 0/04$ $\mu\text{mol/gKW}$) از لحاظ آماری برابر می‌باشند. در گروه UUO، سطوح ADP در کلیه انسدادی ($0/82 \pm 0/08$ $\mu\text{mol/gKW}$) و کلیه غیر انسدادی ($0/67 \pm 0/04$ $\mu\text{mol/gKW}$) نسبت به کلیه‌های مشابه در گروه شاهد افزایش یافتند، درحالی‌که با هم از لحاظ آماری تفاوت نداشتند. مقادیر ATP/ADP (نمودار ۲C) برای گروه کنترل در کلیه‌های راست ($4/61 \pm 0/43$) و چپ ($4/84 \pm 0/53$) با یکدیگر و با مقادیر آن

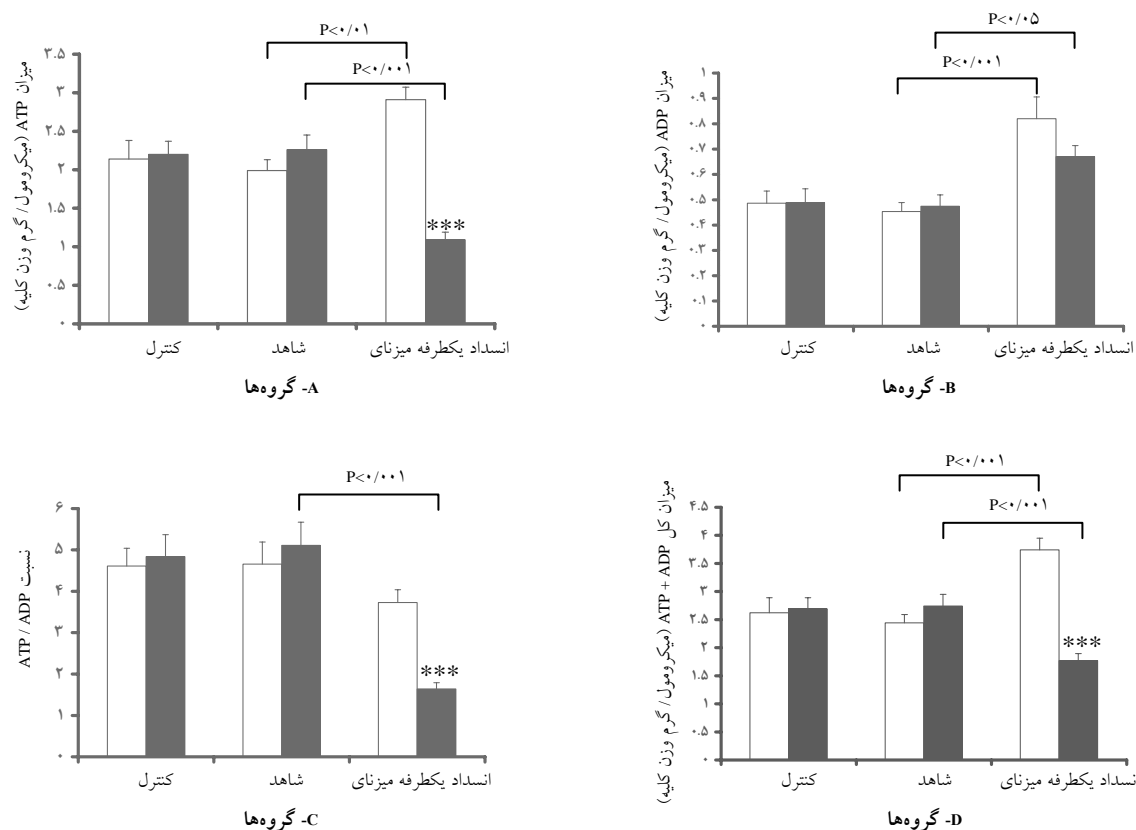
می‌شود. اندازه‌گیری FRAP بر اساس روش Benize در نمونه‌های بافتی صورت پذیرفت. ^{۱۰} به‌طور خلاصه در ابتدا معرف FRAP با ترکیب کردن بافر استات، TPTZ و $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ تهیه شده و سپس ۵۰ میکرولیتر از بافت همگن به آن اضافه، و به‌مدت ده دقیقه در حمام آبی 37°C قرار داده می‌شد. میزان جذب نوری ایجاد شده در 593 nm خوانده و با منحنی استاندارد حاصل از محلول $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ مقایسه و مقدار عددی برحسب $\mu\text{mol/gKW}$ گزارش می‌گردید. اندازه‌گیری سطوح Adenosine Triphosphate (ATP) و Adenosine Diphosphate (ADP) در بافت کلیوی بر اساس روش Lundine صورت گرفت. ^{۱۱} به‌طور خلاصه در ابتدا با استفاده از هموژنایزر، محلول همگن از بافت کلیوی به نسبت یک به ده (W/V) با اسید تری کلرواستیک در ورای پوششی از یخ تهیه می‌شد. بعد از خنثی کردن محلول با بافر فسفاتی و رساندن pH به حدود ۷-۷/۵، ده میکرولیتر از نمونه همگن شده به مخلوطی از آنزیم لوسیفراز و لوسیفیرین اضافه می‌گردید. میزان ATP، بر اساس مقدار نور لومینسنس متصاعد شده بلافاصله با دستگاه لومینومتر اندازه‌گیری می‌شد. سپس به همان میزان از نمونه همگن شده، مخلوطی از فسفوانول پیرووات و پیرووات کیناز اضافه و بعد از گذشت شش دقیقه در درجه حرارت اتاق، تمام ADP موجود در نمونه به ATP تبدیل می‌گردید. به این محلول نیز مخلوط آنزیمی لوسیفراز و لوسیفیرین به‌سرعت اضافه شده و میزان ATP دوم را معین نموده و با تفریق عدد بدست آمده دومی از عدد اول مقدار ADP معلوم می‌گردید. لازم به ذکر است که مقادیر بدست آمده ATP در هر دو مرحله با منحنی استاندارد ATP مقایسه و مقدار عددی بر حسب $\mu\text{mol/gKW}$ گزارش می‌شد. نتایج به‌صورت میانگین \pm خطای معیار گزارش شده است. تست دانکن برای مقایسه بین گروهی و آزمون LSD برای تعیین دقیق اختلافات آماری استفاده گردید. برای مقایسه بین پارامترهای کلیه راست و چپ student t-test انجام شد. میزان $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شد.

یافته‌ها

افزایش سطح MDA بافت کلیه بر اثر انسداد حاد میزناهی: نمودار ۱A نشان می‌دهد که میزان MDA در کلیه‌های راست و چپ برای گروه کنترل به ترتیب $36/78 \pm 1/55$ و $37/14 \pm 1/02$ mol/gKW و برای گروه شاهد به ترتیب $38/16 \pm 1/38$ و $38/64 \pm 1/02$ nmol/gKW بوده و هیچ



نمودار ۱- مقادیر (A) مالون دی آلدئید (MDA) و (B) توانایی آنتی اکسیدانی/ احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (FRAP) در کلیه راست (□) و چپ (■) در گروه‌های انسداد یکطرفه میزنای، شاهد و کنترل. اعداد عبارتند از میانگین ± خطای معیار، * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ مقایسه کلیه راست و چپ در هر گروه



نمودار ۲- مقادیر (A) میزان آدنوزین تری فسفات (ATP)، (B) میزان آدنوزین دی فسفات (ADP)، (C) نسبت ATP/ADP و (D) میزان کل ATP+ADP در کلیه راست (□) و چپ (■) در گروه‌های انسداد یکطرفه میزنای، شاهد و کنترل. اعداد عبارتند از میانگین ± خطای معیار. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ مقایسه کلیه راست و چپ در هر گروه

دو با $p < 0.001$ گردید، درحالی‌که مقادیر این نسبت در کلیه غیر انسدادی و کلیه مشابه در گروه شاهد از لحاظ آماری متفاوت نبودند. در نمودار ۲D مقادیر ATP+ADP کلیه‌های راست و چپ در گروه کنترل (به ترتیب $2/69 \pm 0/20$ و $2/62 \pm 0/27 \mu\text{mol/gKW}$ با یکدیگر و

برای گروه شاهد در کلیه‌های راست ($4/66 \pm 0/53$) و چپ ($5/11 \pm 0/56$) از لحاظ آماری برابر بودند. انسداد حاد میزنای موجب کاهش معنی‌داری در ATP/ADP کلیه انسدادی ($1/64 \pm 0/15$) نسبت به کلیه غیر انسدادی ($3/73 \pm 0/30$) و کلیه مشابه در گروه شاهد (هر

پذیرد، یا با تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام از طریق اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی بافت توسط روش FRAP انجام گردد.^{۱۱} اولین بار Modei و همکاران نقش ROS را در یک مدل انسداد دو طرفه میزنای نشان دادند.^{۱۳} Lin و همکاران نیز یک افزایش در میزان MDA را طی سه روز UUO در رت گزارش کرده‌اند.^{۱۴} محققین تغییرات همو-دینامیکی و مکانیکی به‌وجود آمده در طی مراحل زمانی بعد از UUO را در بافت کلیوی منشأ اصلی تولید رادیکالهای آزاد می‌دانند، به‌علاوه افزایش فزاینده مهاجرت لکوسیتها در ضمن انسداد را نیز از جمله عوامل تکمیلی در تولید ROS ذکر می‌نمایند.^{۱۳، ۱۴} همچنین در خیلی از مطالعات با اندازه‌گیری آنزیمی، کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی را نیز در انسداد بلندمدت میزنای ثابت کرده‌اند.^{۱۵} نتایج تحقیق حاضر برای اولین بار نشان می‌دهد که انسداد حاد میزنای سبب یک افزایش معنی‌داری در میزان MDA بافتی در کلیه انسدادی (نمودار ۱A) به‌همراه کاهش معنی‌داری در میزان FRAP در هر دو کلیه (نمودار ۱B) شده است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ۲۴ ساعت انسداد میزنای، از طریق افزایش تولید ROS و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت، باعث بروز استرس اکسیداتیو در کلیه انسدادی شده است. عمده‌ترین دلایل افزایش تولید ROS در کلیه انسدادی را می‌توان کاهش خون‌رسانی و افزایش فشار داخل توبولی ذکر نمود. درحالی‌که کلیه غیر انسدادی که به‌واسطه فعالیت جیرانی و افزایش عملکردی احتمالاً با افزایش تولید ROS همراه است، با تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی که باعث هزینه شدن از آن و بالطبع کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تام شده است، از بروز استرس اکسیداتیو و در نتیجه افزایش MDA بافتی در این کلیه جلوگیری نموده است. در این مطالعه، UUO حاد سبب یک کاهش شدید در تولید ATP (نمودار ۲A) به‌همراه یک افزایش در سطح ADP (نمودار ۲B) در کلیه انسدادی شد. در تحقیق انجام شده توسط Nito و همکاران، کاهش در میزان ATP کلیوی طی UUO حاد را مرتبط با آسیب میتوکندریال و کاهش ظرفیت اکسیداتیو در کلیه انسدادی دانستند.^۶ مطالعات با کمک میکروسکوپ الکترونی در طی انسداد حاد میزنای تغییراتی در میتوکندری مخصوصاً در توبول پروگزیمال را به‌صورت تغییر شکل در کریستالها و واکنش‌های داخلی نشان داده است.^{۱۶} به‌علاوه، Bander و همکاران هم یک افزایش گلیکولیز بی‌هوازی را در انسداد میزنای گزارش کرده‌اند.^{۱۷} البته در تحقیق Nito و همکاران برخلاف

با مقادیر آنها در گروه شاهد (به‌ترتیب $2/44 \pm 0/15 \mu\text{mol/gKW}$ و $2/74 \pm 0/21$) از لحاظ آماری برابر می‌باشند. در گروه UUO نسبت به گروه شاهد، ATP+ADP در کلیه انسدادی ($1/77 \pm 0/123 \mu\text{mol/gKW}$) کاهش و در کلیه غیر انسدادی ($3/74 \pm 0/21 \mu\text{mol/gKW}$) افزایش یافتند و با یکدیگر نیز متفاوت بودند ($p < 0/001$).

بحث

ترکیبات فعال مشتق‌شده از اکسیژن (ROS)، ملکولهای بسیار واکنش‌پذیری هستند و آسیبهای جبران‌ناپذیری به ماکرومولکولهای بدن جانداران از جمله DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدراتها وارد می‌سازند. در شرایط فیزیولوژیک سوپراکسید (O_2^-) در میتوکندری توسط آنزیم‌های زنجیره انتقال‌الکترون، در سیتوزول توسط آنزیم‌هایی نظیر گزانتین اکسیداز و NAD(P)H اکسیداز، در شبکه آندوپلاسمی توسط سیتوکروم P450، و در غشاء پلاسمایی توسط آنزیم فسفولیپاز A_2 طی متابولیسم اسیدهای آراشیدونیک تولید می‌گردد، که سپس به سایر ROS هم می‌تواند تبدیل شود. میزان ROS در سلول‌ها و بافتهای در شرایط طبیعی، به‌علت تعادل بین تولید و حذف آنها توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، در یک حد معینی ثابت می‌ماند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مشتمل است بر آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز که ROS را سمیت‌زدایی می‌کنند، و ترکیبات غیر آنزیمی نظیر ویتامین‌ها (به‌خصوص E و C)، گلوکاتایون، آلبومین و اورات که عمدتاً ROS را scavenge می‌نمایند.^{۱۲} به‌دلیل تعادل تقریبی بین تولید و میزان فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، به‌سادگی ممکن است که این تعادل به نفع تولید ROS به‌هم بخورد و همین موضوع باعث آشفته شدن بیوشیمی سلول‌ها گردد. این عدم تعادل را استرس اکسیداتیو می‌نامند و منجر به آسیب‌های بافتی می‌شود.^۳ از آنجایی‌که رادیکالهای آزاد نیمه‌عمر کوتاهی دارند، بنابراین ارزیابی استرس اکسیداتیو به‌طور مستقیم به‌سادگی میسر نیست، و برای ارزیابی آن یا باید میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را بررسی کرد و یا مقدار محصولات ناشی از استرس اکسیداتیو مثل مالون دی‌آلدئید (MDA) که محصول نهایی حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای چرب غیر اشباع است را تعیین نمود، که در واقع حاکی از افزایش حضور رادیکالهای آزاد می‌باشد. تعیین وضعیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند با اندازه‌گیری هر کدام از اجزاء آن صورت

تولید ATP، میزان مصرف هم بالا است که منجر به افزایش تجمعی ADP شده است. البته عدم تغییر در نسبت ATP/ADP کلیه غیر انسدادی (نمودار ۲C) حاکی از وجود شرایط متابولیسمی نرمال در این کلیه است. بنابراین در طی انسداد حاد میزانی، کلیه غیر انسدادی با یک افزایش فعالیت متابولیسم اکسیداتیو جبرانی اما طبیعی مواجه است که همراه با افزایش در میزان تولید ATP از یک طرف و افزایش مصرف آن (افزایش تشکیل ADP) از طرف دیگر روبروست و میزان مصرف آن در این کلیه هم افزایش یافته است (نمودار ۲D). لازم به ذکر است که عدم تفاوت بین گروه‌های کنترل و شاهد در مقادیر پارامترهای اندازه‌گیری شده نشان‌دهنده آن است که بیهوشی، جراحی، تزریق آنتی‌بیوتیک‌ها و دوره بهبودی تأثیری بر روی تعادل اکسیداتیو و وضعیت متابولیسم کلیوی نداشته‌اند. براساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان عنوان نمود که انسداد حاد میزانی باعث برقراری استرس اکسیداتیو و نقص در متابولیسم هوازی در کلیه انسدادی، به‌همراه یک افزایش جبرانی در متابولیسم هوازی و بدون بروز استرس اکسیداتیو در کلیه غیر انسدادی می‌شود. سپاسگزاری: از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل فراهم نمودن هزینه این تحقیق (طرح پژوهشی شماره ۲۴۳۴-۸۴) تشکر می‌نمایم.

این مطالعه، کاهش در سطح ADP کلیه انسدادی مشاهده شده که علت آن را ناشی از تبدیل شدنش به AMP سپس به آدنوزین و در نهایت خروج از سلول عنوان نمودند. درحالی‌که افزایش ADP کلیه انسدادی در مطالعه حاضر حاکی از آن است که سلول‌های توبولی جهت تامین انرژی فعالیت‌های خود، علیرغم کاهش در انتقال توبولی بعد از انسداد حاد میزانی، ATPs تولیدی را سریعاً مصرف نموده و به ADPs تبدیل می‌نمایند و به‌علت کاهش ظرفیت تولید انرژی از مسیرهای هوازی سرعت مصرف از تولید بیشتر گردیده و در نتیجه سطح ATP کاهش و سطح ADP افزایش و بنابراین نسبت ATP/ADP کاهش می‌یابد (نمودار ۲C) که نشان‌دهنده وجود اختلال در متابولیسم اکسیداتیو می‌باشد. البته کاهش میزان ATP+ADP در کلیه انسدادی (نمودار ۲D) بیانگر این امر می‌باشد که طی دوره ۲۴ ساعته انسداد بخشی از ADP به AMP و آدنوزین تبدیل و آدنوزین هم احتمالاً از سلول خارج شده است. افزایش سطح ATP مشاهده شده در کلیه غیر انسدادی (نمودار ۲A) به احتمال زیاد ناشی از افزایش بار کاری جبرانی این کلیه به‌واسطه کم کاری کلیه انسدادی و لذا افزایش میزان متابولیسم اکسیداتیو در آن می‌باشد. همچنین افزایش میزان ADP در کلیه غیر انسدادی (نمودار ۲B) مویده آن است، که علیرغم افزایش

References

1. Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283: 861-75.
2. Klahr S. New insights into the consequences and mechanisms of renal impairment in obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 689-99.
3. Shah SV. Oxidants and iron in progressive kidney disease. *J Ren Nutr* 2006; 16: 185-89.
4. Palm F, Cederberg J, Hansell P, Liss P, Carlsson PO. Reactive oxygen species cause diabetes-induced decrease in renal oxygen tension. *Diabetologia* 2003; 46: 1153-60.
5. Blondin J, Purkerson ML, Rolf D, Schoolwerth AC, Klahr S. Renal function and metabolism after relief of unilateral ureteral obstruction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975; 150: 71-6.
6. Nito H, Descoedres C, Kurokawa K, Massry SG. Effect of unilateral obstruction on renal cell metabolism and function. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 60-71.
7. Kurokawa K, Fine LG, Klahr S. Renal metabolism in obstructive nephropathy. *Semin Nephrol* 1982; 2: 31-39.
8. Buerkert J, Martin D, Head M. Effect of acute ureteral obstruction on terminal collecting duct function in the weanling rat. *Am J Physiol* 1979; 236: 260-7.
9. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
10. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 1999; 299: 15-27.
11. Dillioglulil MO, Maral Kir H, Gulkac MD, Ozon Kanli A, Ozdogan HK, Acar O, Dillioglulil O. Protective effects of increasing vitamin E and a doses on cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. *Urol Int* 2005; 75: 340-4.
12. Modi KS, Schreiner GF, Purkerson ML, Klahr S. Effects of probucol in renal function and structure in rats with subtotal kidney ablation. *J Lab Clin Med* 1992; 120: 310-7.
13. Lin KC, Krieg RJ Jr, Saborio P, Chan JC. Increased heat shock protein-70 in unilateral ureteral obstruction in rats. *Mol Genet Metab* 1998; 65: 303-10.
14. Kinter M, Wolstenholme JT, Thornhill BA, Newton EA, McCormick ML, Chevalier RL. Unilateral ureteral obstruction impairs renal antioxidant enzyme activation during sodium depletion. *Kidney Int* 1999; 55: 1327-34.
15. Tannenbaum J, Purkerson ML, Klahr S. Effect of unilateral ureteral obstruction on metabolism of renal lipids in the rat. *Am J Physiol* 1983; 245: 254-62.
16. Bander SJ, Buerkert JE, Martin D, Klahr S. Long-term effects of 24-hr unilateral ureteral obstruction on renal function in the rat. *Kidney Int* 1985; 28: 614-20.

Metabolic and oxidative stress indices in acute unilateral ureteral obstructive nephropathy in rat

Ashtiyani SC.¹
Moosavi SMS.^{1*}
Hosseinkhani S.²
Shirazi M.³

1- Department of Physiology,
Shiraz University of Medical
Sciences

2- Department of Biochemistry,
Tarbiat Modares University

3- Department of Urology, Shiraz
University of Medical Sciences

Abstract

Background: Ureteral obstruction, leading to urinary stasis and elevated pressure in the proximal part of urinary tract, causes progressive renal dysfunction. This study was designed to evaluate the status of oxidative stress and metabolic defect in acute unilateral ureteral obstruction (UUO).

Methods: Experiments were performed on three groups of male Sprague-Dawley rats (n=10 in each group). In the UUO group, rats were lightly anesthetized by ether and the left ureter was occluded by means of a sterile surgical procedure. Twenty-four hours after UUO-induction, both kidneys were removed and stored at -70 °C. In the sham group, anesthesia and surgery were performed without ureteral occlusion, and the control group received no surgical procedure. The kidney samples were assessed to measure the levels of ATP and ADP by the luciferin-luciferase method for determining metabolic status. In addition, the levels of malondialdehyde (MDA) and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) of the kidneys were measured to evaluate the redox state. Data are expressed as means \pm SEM per gram of kidney weight (gKW). The comparisons were performed using paired t-test for intra-group analysis, and ANOVA followed by Duncan's post-hoc test and then LSD test for inter-group analysis. Significance was taken at $p < 0.05$.

Results: The comparisons between the UUO and sham groups indicated that 24 hours of UUO increased levels of MDA (51.42 ± 1.86 vs. 38.64 ± 1.02 nmol/gKW, respectively; $p < 0.001$) and ADP (0.67 ± 0.04 vs. 0.47 ± 0.045 μ mol/gKW, respectively; $p < 0.01$), but decreased levels of FRAP (2.44 ± 0.18 vs. 4.28 ± 0.27 μ mol/gKW, respectively), ATP (1.09 ± 0.10 vs. 2.26 ± 0.19 μ mol/gKW, respectively) and ATP/ADP ratio (1.64 ± 0.14 vs. 5.11 ± 0.56 , respectively) in the obstructed kidneys, all $p < 0.001$. In the non-obstructed kidneys, the levels of ATP and ADP were higher ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively), while the levels of MDA and ATP/ADP ratio were equal to those of the sham group.

Conclusion: Twenty-four hours of acute UUO induces oxidative stress and reduces the aerobic metabolism in obstructed kidneys, whereas non-obstructed kidneys with a normal redox state show the higher levels of metabolism.

Keywords: Kidney, acute unilateral ureteral obstruction, oxidative stress, renal metabolism, ATP, ADP.

* Corresponding author: Department
of Physiology, Shiraz Medical School,
Zand Avenue, Shiraz
Tel: +98-711-2302026
email: mmoosavi@sums.ac.ir