

## اثر اسیدهای چرب امگا3 بر استرس اکسیداتیو در نارسایی حاد کلیه ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن

سید جواد حاجی میراسماعیل<sup>1</sup>، سید حسین داوودی<sup>2</sup>، نسیم نمازی<sup>3</sup>، غلامعلی جاودان<sup>4</sup>، حمیدرضا پازکی طرودی<sup>5</sup>، مرجان عجمی<sup>6</sup>

- 1- استادیار بخش کاردیولوژی، دانشکده پزشکی، بیمارستان حضرت رسول اکرم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- 2- استادیار گروه تغذیه بالینی و رژیم درمانی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 3- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم تغذیه، شعبه بین الملل، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 4- دانشجوی دکتری تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- 5- استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- 6- نویسنده مسئول: استادیار گروه تحقیقات سیاستگذاری و برنامه‌ریزی غذا و تغذیه، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیک nutritionist80@gmail.com

تاریخ دریافت: 92/7/24

تاریخ پذیرش: 92/9/20

### چکیده

**سابقه و هدف:** ایسکمی رپرفیوژن یعنی باز گرداندن مجدد جریان خون به بافتی که دچار ایسکمی یا کمبود اکسیژن شده است و ممکن است به بروز نارسایی حاد کلیوی منتهی شود. این مطالعه با هدف بررسی اثر درمان با اسیدهای چرب امگا3 بر آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن کلیه رت انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** نفروکتومی کلیه راست بر روی 81 رت نروستار با وزن 255-300gr انجام شد و به مدت 21 روز جهت بر طرف شدن استرس ناشی از عمل نگهداری شدند. قبل از ایسکمی رپرفیوژن (6، 24، 48 ساعت رپرفیوژن) رت‌ها به مدت 14 روز اسید چرب امگا3 (دوکوزاهگزانوئیک اسید، ایکوزاپنتانوئیک اسید) 200 mg/kg/d یا آب مقطر دریافت کردند. فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، آنزیم آنتی‌اکسیدان سوپراکسی دسموتاز (SOD)، نیتروژن اوره خون (BUN)، کراتینین سرم (SCr)، کلیرانس کراتینین (CCr)، کسر تصفیه سدیم (FENa) و هیستولوژی کلیه مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در گروه ایسکمی رپرفیوژن، SCr، BUN، FENa، افزایش ( $p < 0/01$ ) و فعالیت CAT و SOD کاهش معنی‌دار یافت ( $p < 0/05$ ). در گروه دریافت کننده اسید چرب امگا3 شاخص‌های SCr، BUN، FENa کاهش، کلیرانس کراتینین و فعالیت CAT و SOD در مقایسه با گروه IR، افزایش معنی‌دار یافت ( $p < 0/05$ ). یافته‌ها نشان دادند که ایسکمی رپرفیوژن سبب آسیب بافتی بیشتر در مدت 6 ساعت رپرفیوژن ( $p < 0/05$ )، آسیب بافتی خفیف‌تر در مدت 24 تا 48 ساعت رپرفیوژن گشت ( $p < 0/01$ ) و در گروه امگا3 مقایسه با گروه IR آسیب بافتی به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو هفته مصرف امگا3 قبل از ایسکمی عملکرد کلیوی را با کاهش SCr، BUN، FENa و افزایش کلیرانس کراتینین بهبود داده و سبب کاهش استرس اکسیداتیو گردید.

**واژگان کلیدی:** اسیدهای چرب امگا 3 (دوکوزا هگزانوئیک اسید و ایکوزاپنتانوئیک اسید)، ایسکمی رپرفیوژن، استرس اکسیداتیو، نارسایی حاد کلیه

### • مقدمه

القاء استرس اکسیداتیو منجر به التهاب و آسیب اکسیداتیو بافت می‌گردد (1). ایسکمی رپرفیوژن کلیه یکی از عواملی است که منتهی به بروز نارسایی حاد کلیوی می‌گردد. نارسایی حاد کلیوی سندرمی است که وجوه مشخصه آن

ایسکمی رپرفیوژن IR (reperfusion) یعنی باز گرداندن مجدد جریان خون به بافتی که دچار ایسکمی یا کمبود اکسیژن شده است، فقدان اکسیژن و مواد مغذی در خون در طول دوره ایسکمی و بازگشت مجدد گردش خون، از طریق

### • مواد و روش‌ها

81 رت نر نژاد ویستار با وزن 255 تا 300 گرم بوده که از انستیتو پاستور ایران تهیه و در حرارت بین 25-22 درجه سانتی‌گراد در آزمایشگاه نگهداری شدند. سیکل نوری، 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی، برای نگهداری این حیوانات رعایت گردید. رت‌ها برای یک هفته در آزمایشگاه قرار داده شدند به گونه‌ای که در عین دسترسی آزاد به آب و غذا با شرایط آزمایشگاه سازش پیدا کنند.

تمام مراحل نگهداری، فرایندهای جراحی و بیهوشی حیوانات طبق موارد ذکر شده در آیین‌نامه اخلاقی نحوه برخورد با حیوانات آزمایشگاهی مصوبه دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که بر اساس آیین‌نامه بر خورد با حیوانات آزمایشگاهی تنظیم شده بود، انجام گردید. در پایان آزمایش حیوانات تحت بی‌هوشی و بدون درد با گیوتین کشته شدند و نمونه‌های مورد نیاز از آنها تهیه گردید.

**داروها و روش‌های تزریق:** کتامین 10 درصد (Ketamine) دز تزریقی 50mg/kg و زایلوزین 4 درصد (Xylazine) دز تزریقی 4mg/kg از طریق تزریق داخل صفاقی، خریداری شده از شرکت Alfasan Chemical (Woerden and Holland)، اسیدهای چرب امگا-3 (شامل 600 میلی‌گرم EPA و 400 میلی‌گرم DHA در هر گرم از محصول خالص، بدون آنتی‌اکسیدان) خریداری شده از شرکت Biotik-do-Brasil Industria-e-Comercio Ltda, Brazil به صورت 200 mg/kg (120 میلی‌گرم از EPA و 80 میلی‌گرم از DHA) تهیه و توسط سرنگ خاص گاوآژ به حیوانات داده شد. برای گروه کنترل آب مقطر گاوآژ گردید. 81 رت به صورت تصادفی در 9 گروه 9 تایی قرار گرفتند:

گروه اول، کنترل: رژیم استاندارد (شامل کربوهیدرات 46 درصد)، پروتئین (20 درصد)، چربی (16 درصد) و فیبر (16 درصد) همراه با گاوآژ آب مقطر 1 ml/day به مدت 14 روز+ جراحی sham + 6 ساعت رپرفیوژن گروه دوم، IR: رژیم استاندارد همراه با گاوآژ آب مقطر 1 ml/day (14 روز) + 45 دقیقه ایسکمی + 6 ساعت رپرفیوژن

گروه سوم، گروه امگا-3: رژیم استاندارد همراه با گاوآژ اسیدهای چرب امگا-3 (200 mg/kg/day) (14 روز) + 45 دقیقه ایسکمی + 6 ساعت رپرفیوژن

کاهش سریع میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR) ظرف چند ساعت تا چند هفته، احتباس مواد زائد نیتروژن دار مثل ازت اوره خون، کراتینین سرم، اختلالات حجم مایع خارج سلولی، هوموستاز الکترولیت و اسید و باز و همچنین کاهش دفع ادرار می‌باشد (2). آسیب ناشی از IR تخریب بافتی است و در زمانی که بافت دچار ایسکمی و در نتیجه آن کمبود اکسیژن و مواد مغذی می‌گردد، با برقراری مجدد جریان خون به بافت، به دنبال آن بروز التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز ایجاد می‌گردد (3). تعداد زیادی از مطالعات روی ارگان‌های متعددی شامل قلب، کلیه و سیستم عصبی انجام گرفته و نشان می‌دهند که استفاده از رژیم درمانی با اسیدهای چرب امگا3 به شکل قابل ملاحظه‌ای قادر است آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن را کاهش دهد (4-6). استراتژی‌های متعددی برای به تأخیر انداختن شروع آسیب ناشی از IR پیشنهاد شده که تغذیه اسیدهای چرب امگا-3 از مهم‌ترین این موارد می‌باشد. همچنین مطالعات زیادی بر روی حیوانات و انسان، نشان داده است که امگا3 بسیاری از فرایندهای حاصل از عملکرد ارگان‌ها (مانند کاهش چربی خون بالا، فشار خون بالا، کاهش کراتینین سرم) را بهبود می‌بخشد (7-10). مطالعات نشان داده‌اند اسیدهای چرب امگا 3 در سلول‌های قلبی باعث کاهش مصرف اکسیژن و افزایش ذخائر اکسیژن عروق کرونر می‌شود. این ویژگی باعث افزایش مقاومت سلول‌های قلبی در برابر آسیب ایسکمیک می‌شود (3). التهاب، نقش اساسی در پاتوژنز آسیب ایسکمیک کلیه دارد و یکی از علل اساسی در نارسایی کلیه می‌باشد. بررسی‌های کلینیکی نشان داده اند اسیدهای چرب امگا 3 می‌تواند عملکرد کلیه را بهبود بخشد و به این که مطالعات اندکی در رابطه با اثر اسیدهای چرب امگا 3 بر عملکرد کلیه وجود دارد، ما لذا این مطالعه با هدف بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی EPA+DHA را به طور مستقیم بر عملکرد فیزیولوژیک کلیه و شاخص‌های آن در کلیه ایسکمیک انجام شد. در این راستا، تاثیر مصرف خوراکی اسیدهای چرب امگا3 (EPA+DHA) بر ایسکمی رپرفیوژن کلیه مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های کاتالاز (CAT) و سوپراکسی دسموتاز (SOD)، نیتروژن اوره خون (BUN)، کراتینین سرم (SCr)، کسر تصفیه سدیم (FENa) و هیستولوژی کلیه در زمان‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفت.

پس از لمس دنده آخر زیر این دنده برش داده شد، کلیه و شریان کلیوی چپ نمایان شده و بعد از مشاهده نبض شریانی، این شریان با کلمپ نرم بسته شده و حیوان گرم نگه داشته شد. بعد از 45 دقیقه، کمی سرم فیزیولوژی روی محل جراحی ریخته و به آرامی کلمپ را برداشته و جریان خون مجدداً برقرار گردید. بعد از بخیه زدن محل برش و ضد عفونی کردن آن حیوان به قفس متابولیت منتقل شد. بعد از 6، 24 و 48 ساعت نمونه ادرار را جمع آوری کرده و حجم ادرار ثبت شد. سپس حیوانات سرشان با گیوتن زده شد و نمونه خون آنها را جمع کرده و بعد از سانتریفوژ و جدا کردن سرم نمونه‌ها به فریزر  $30^{\circ}\text{C}$ - منتقل گردید. کلیه‌های چپ بعد از تمیز کردن توسط شکاف طولی دقیق به دو قسمت تقسیم شد، یک قسمت برای اندازه‌گیری فعالیت بافتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسی دسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) به کار رفت. قسمت دیگر جهت تعیین آسیب پاتولوژیک استفاده گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها:** از آنجا که تمام داده‌ها توزیع نرمالی داشتند [Kolmogorov-Smirnov test (K-S test)] مقایسه بین گروهی با بهره‌گیری از آنالیز واریانس یک طرفه One-Way Analysis Of Variance (ANOVA) و به دنبال آن برای تعیین تفاوت بین دو گروه از تست Post Hoc Tukey's استفاده شد. در تمام آنالیزها میزان  $p < 0/05$  و  $p < 0/01$  به عنوان تفاوت معنی‌دار تلقی گردید.

#### • یافته‌ها

وزن رت‌ها در ابتدای گاوژ امگا3 و همچنین در پایان مطالعه (قبل از کشتن حیوانات) اندازه‌گیری شد. میانگین وزن در گروه‌های 6، 24 و 48 ساعته رپرفیوژن در گروه امگا3 در ابتدا و انتهای مطالعه تغییرات معنی‌داری نداشت.

نتایج نشان داد، شاخص‌های سدیم سرم، کراتینین و سدیم ادرار در گروه کنترل در زمان‌های مختلف تفاوتی نداشت، در حالی که ایسکمی 45 دقیقه و رپرفیوژن، 6، 24 و 48 ساعته، به طور معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) سطح سرم کراتینین و نیتروژن اوره خون را در مقایسه با گروه کنترل، با زمان مشابه افزایش داد. دو هفته مصرف خوراکی امگا3 ( $200\text{mg/kg}$ ) در روز سبب کاهش کراتینین و اوره سرم در مقایسه با گروه ایسکمی رپرفیوژن پس از 6، 24 و 48 ساعت از رپرفیوژن گردید (جدول 3-1).

حد مجاز کلیرانس کراتینین که به عنوان شاخص GFR استفاده شد، در گروه IR، پس از 45 دقیقه ایسکمی، 6، 24

گروه چهارم، کنترل: رژیم استاندارد همراه با گاوژ آب مقطر 1 ml/day (14روز) + جراحی sham + 24ساعت رپرفیوژن

گروه پنجم، گروه IR: رژیم استاندارد همراه با گاوژ آب مقطر 1 ml/day (14روز) + 45 دقیقه ایسکمی + 24ساعت رپرفیوژن

گروه ششم، گروه امگا-3: رژیم استاندارد همراه با گاوژ اسیدهای چرب امگا-3 ( $200\text{mg/kg/day}$ ) (14روز) + 45 دقیقه ایسکمی + 24ساعت رپرفیوژن

گروه هفتم، گروه کنترل: رژیم استاندارد همراه با گاوژ آب مقطر 1 ml/day (14روز) + جراحی sham + 48ساعت رپرفیوژن

گروه هشتم، گروه IR: رژیم استاندارد همراه با گاوژ آب مقطر 1 ml/day (14روز) + 45 دقیقه ایسکمی + 48ساعت رپرفیوژن

گروه نهم، گروه امگا-3: رژیم استاندارد همراه با گاوژ اسیدهای چرب امگا-3 ( $200\text{mg/kg/day}$ ) (14روز) + 45 دقیقه ایسکمی + 48ساعت رپرفیوژن

رت‌های سفید صحرایی نر نژاد ویستار با وزن 255-300 گرم به وسیله گزیلوکائین ( $10\text{mg/kg}$  + کتامین  $50\text{mg/kg}$ ) با تزریق داخل صفاقی (IP) بیهوش شدند، سپس رت در وضعیت فلانک راست قرار گرفت و پس از لمس دنده آخر، زیر این دنده برش داده شد، کلیه و پایک کلیوی راست نمایان گردید، نخ کرومیک از زیر پایک کلیوی رد شد، پایک را بسته، سپس کلیه راست را برداشته (نفروکتومی) و سپس محل برش را بخیه زده و با بتادین ضد عفونی کردیم. بعد از به هوش آمدن حیوان، جهت جلوگیری از عفونت به آنها آنتی بیوتیک آموکسی سیلین  $50\text{mg/kg}$  به صورت داخل صفاقی تزریق شد. حیوانات به حیوانخانه منتقل شده و در محیط تمیز (12 ساعت نور و تاریکی) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

دو هفته قبل از ایجاد ایسکمی در گروه امگا3، گاوژ امگا3 آغاز شد. یک روز قبل از ایسکمی حیوانات در قفس متابولیت (Metabolit Cage) قرار گرفتند. پس از اعمال ایسکمی حیوانات مجدداً به قفس بر گشتند.

پس از 21 روز در گروه‌هایی که باید تحت ایسکمی رپرفیوژن کلیه چپ واقع می‌شدند، حیوانات با گزیلوکائین ( $10\text{mg/kg}$ ) به علاوه کتامین ( $50\text{mg/kg}$ ) با تزریق داخل صفاقی بیهوش شده و در وضعیت فلانک چپ قرار گرفت،

پس از ایسکمی رپرفیوژن، در زمان‌های مختلف رپرفیوژن در مقایسه با رت‌های گروه کنترل افزایش یافت. دز مصرفی امگا3 به طور معنی‌دار سبب کاهش FENa پس از 6، 24 و 48 ساعت از رپرفیوژن گشت ( $p < 0/05$ ).

و 48 ساعت رپرفیوژن  $p < 0/05$  در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. مصرف خوراکی امگا3 (روزانه 200mg/kg) سبب افزایش کلیرانس کراتینین پس از 6، 24 و 48 ساعت رپرفیوژن در مقایسه با گروه IR شد. ( $P < 0/05$ ). برای ارزیابی عملکرد توبول پروگزیمال، FENa محاسبه گردید. FENa

**جدول 1.** مقایسه شاخص‌های استرس اکسیداتیو و عملکردی کلیه پس از ایسکمی رپرفیوژن (6 ساعت رپرفیوژن) در گروه‌های ایسکمی

رپرفیوژن، امگا3 + ایسکمی رپرفیوژن و کنترل			گروه	متغیر
6h Control	6h IR	6h Omega+IR		
#0/52±0/07 <sup>a</sup>	*#1/84 ± 0/11 <sup>b</sup>	*0/84±0/09 <sup>a</sup>		(mg/d) Serum -Cr
#11/36±1/14 <sup>c</sup>	*#31/54±3/15 <sup>b</sup>	*19/72±1/72 <sup>a</sup>		(mg/d) Serum -BUN
#1/01±0/23 <sup>a</sup>	*#0/23±0/05 <sup>b</sup>	*0/68±0/09 <sup>a</sup>		Ccr
#5/0±0/76 <sup>a</sup>	*#23/0±2/93 <sup>b</sup>	*11/0±1/84 <sup>a</sup>		FENa
#72/03±1/85 <sup>a</sup>	*#22/02±3/59 <sup>b</sup>	*62/01±1/23 <sup>a</sup>		(nmol/mg) SOD
#1/68±0/1 <sup>c</sup>	*#0/74±0/03 <sup>b</sup>	*1/011±0/24 <sup>a</sup>		(nmol/mg) CAT

حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌هاست ( $p < 0/05$ )

**جدول 2.** مقایسه شاخص‌های استرس اکسیداتیو و عملکردی کلیه پس از ایسکمی رپرفیوژن (24 ساعت رپرفیوژن) در گروه‌های ایسکمی

رپرفیوژن، امگا3 + ایسکمی رپرفیوژن و کنترل			گروه	متغیر
24h Control	24h IR	24h Omega+IR		
#0/5±0/04 <sup>a</sup>	*#1/67±0/14 <sup>b</sup>	*0/78±0/08 <sup>a</sup>		(mg/d) Serum -Cr
#12/08±1/09 <sup>a</sup>	*#28/71±2/6 <sup>b</sup>	*16/62±1/64 <sup>a</sup>		(mg/d) Serum -BUN
#1/18±0/3 <sup>a</sup>	*#0/26±0/02 <sup>b</sup>	*0/84±0/11 <sup>a</sup>		Ccr
#6/0±0/52 <sup>a</sup>	*#20/0±2/16 <sup>b</sup>	*10/0±1/73 <sup>a</sup>		FENa
#76/7±1/43 <sup>a</sup>	*#27/37±3/41 <sup>b</sup>	*63/01±1/69 <sup>a</sup>		(nmol/mg) SOD
#1/48±0/22 <sup>c</sup>	*#0/87±0/01 <sup>b</sup>	*1/36±0/5 <sup>a</sup>		(nmol/mg) CAT

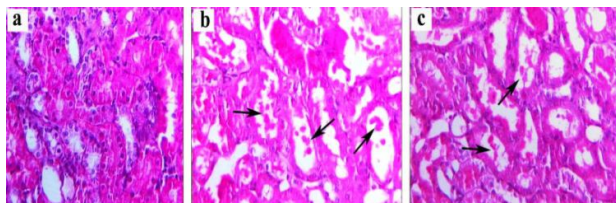
حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌هاست ( $p < 0/05$ )

**جدول 3.** مقایسه شاخص‌های استرس اکسیداتیو و عملکردی کلیه پس از ایسکمی رپرفیوژن (48 ساعت رپرفیوژن) در گروه‌های ایسکمی

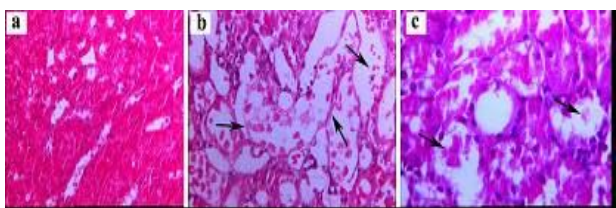
رپرفیوژن، امگا3 + ایسکمی رپرفیوژن و کنترل			گروه	متغیر
48h Control	48h IR	48h Omega+IR		
#0/55±0/04 <sup>a</sup>	*#1/53±0/12 <sup>b</sup>	*0/82±0/06 <sup>a</sup>		(mg/d) Serum -Cr
#10/61±0/9 <sup>a</sup>	*#21/18±3/04 <sup>b</sup>	*14/73±1/19 <sup>a</sup>		(mg/d) Serum -BUN
#1/05±0/3 <sup>a</sup>	*#0/4±0/25 <sup>b</sup>	*0/93±0/12 <sup>a</sup>		Ccr
#4/0±0/52 <sup>a</sup>	*#22/5±2/03 <sup>b</sup>	*9/3±0/12 <sup>a</sup>		FENa
70/09±2/69 <sup>a</sup>	43/96±3/50 <sup>b</sup>	*66/00±1/35 <sup>a</sup>		(nmol/mg) SOD
#1/56±0/41 <sup>a</sup>	1/25±0/17 <sup>a</sup>	*1/59±0/22 <sup>a</sup>		(nmol/mg) CAT

حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه‌هاست ( $p < 0/05$ )

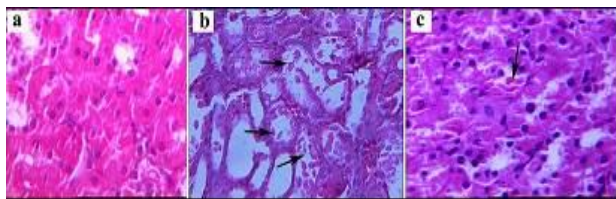
گروه‌های IR آسیب بافتی درجه 2 به علاوه درجه 3 در قسمت‌های اصلی لوله‌های توبول پروگزیمال مشاهده گردید و در گروه امگا3 به طور معنی‌داری آسیب توبولی کاهش یافت ( $P<0/05$ ). همچنین در این گروه در مقایسه با گروه IR، تخریبات سلولی و ورم توبولی در برخی قسمت‌های نواحی مورد مطالعه کمتر بود.



**شکل 1.** هیستولوژی کلیه 6 ساعت پس از رپرفیوژن  
a، گروه کنترل ظاهر طبیعی در اکثر برش‌ها نشان دادند. (آسیب بافتی درجه صفر تا یک)  
b، گروه IR که آسیب‌های ملایم تا متوسط، بصورت تورم توبولی نشان دادند. (→)  
c، DHA+EPA اثری بر کاهش آسیب کلیوی ایجاد شده از IR نداشت



**شکل 2.** هیستولوژی کلیه 24 ساعت پس از رپرفیوژن  
a، گروه sham در اکثر برش‌ها ظاهر طبیعی نشان دادند.  
b، گروه IR در اکثر برش‌ها آسیب متوسط و شدید نشان داد. در قسمت اصلی توبول پروگزیمال، بسیاری از بقایای سلولی و سلول‌های اپیتلیال جدا گشته و سبب تورم توبولی گشتند.  
c، DHA+EPA سبب کاهش آسیب کلیوی ایجاد شده از IR (خفیف تا متوسط) شد. (→)



**شکل 3.** هیستولوژی کلیه 48 ساعت پس از رپرفیوژن  
a، گروه کنترل در اکثر برش‌ها ظاهر طبیعی نشان دادند.  
b، IR در اکثر برش‌ها آسیب ملایم تا شدید نشان داد تخریب بقایای سلول اپیتلیال و اتساع توبول مشاهده شد.  
c، DHA+EPA سبب کاهش آسیب کلیوی ایجاد شده از IR شد. (→)

آسیب اکسیداتیو و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: در این بررسی، آنزیم آنتی‌اکسیدان سوپراکسی دسموتاز (SOD) پس از 6 و 24 ساعت رپرفیوژن در گروه ایسکمی نسبت به گروه کنترل در سطح پایین ماند، در حالی که میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های امگا3 با دوز 200 mg/kg در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ( $P<0/05$ ). فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT) در گروه IR پس از 6 تا 24 ساعت رپرفیوژن، نسبت به گروه امگا3 ( $P<0/05$ ) کاهش یافت. کمترین مقدار فعالیت کاتالاز در گروه‌های IR پس از 6 ساعت رپرفیوژن بود. اگر چه فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های تحت درمان با امگا3 پس از 6 و 24 ساعت رپرفیوژن پایین‌تر از فعالیت این آنزیم در مقایسه با گروه کنترل ( $P<0/05$ ) بود، اما نسبت به فعالیت کاتالاز در گروه‌های IR که رپرفیوژن با مدت مشابهی را تجربه کرده بودند ( $P<0/05$ ) بیشتر بود. پس از 48 ساعت رپرفیوژن، فعالیت کاتالاز به سطح فیزیولوژیک برگشت.

**ارزیابی بافت شناسی کلیه:** کلیه‌های وارد شده به محیط فرمالین 10 درصد توسط Hematoxylin and Eosin (H&E) تثبیت شده و شدت آسیب ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن در زیر دید میکروسکپ نوری توسط روش جابلونسکی از 0 تا 4 درجه بندی گردید.

0، بدون آسیب و علامتی از نکروز  
1، علائم خفیف آسیب بافتی و ایجاد نکروز سلول‌های منفرد  
2، علائم متوسط آسیب بافتی و ایجاد نکروز  
3، آسیب و نکروز 1/3 انتهایی توبول پروگزیمال  
4، آسیب و نکروز هر سه قسمت توبول پروگزیمال

درجه رتبه بندی صفر بافت شناسی در 91/1 درصد و 95/6 درصد و 88/9 درصد از عکس‌های تهیه شده به ترتیب در 6، 24 و 48 ساعت پس از جراحی کنترل مشاهده شد. پس از 6 ساعت رپرفیوژن در گروه IR آسیب بافتی درجه 1+ و 2+ (اتساع توبول پروگزیمال و ادم بینابینی در نواحی کوچکی از محل‌های مورد مطالعه) مشاهده گردید. آسیب بافت کلیوی در 30 درصد و 37/8 درصد از عکس‌ها مشاهده شدند. اما در گروه امگا3، هیچ گونه تأثیری بر روی آسیب بافتی ناشی از IR پس از 6 ساعت رپرفیوژن مشاهده نشد. نتایج نشان داد پس از 24 و 48 ساعت رپرفیوژن در

## • بحث

آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن به عنوان عاملی که باعث بدتر شدن نتیجه پیوند می‌شود، شناخته شده است. مطالعات بالینی و آزمایشگاهی نشان می‌دهند که پیشگیری یا کاهش آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن می‌تواند به بهبود نتایج حاصل از پیوند کلیه منجر شود (11).

مطالعه حاضر جهت تعیین نقش مصرف اسیدهای چرب امگا 3 بر روی آسیب ناشی از IR کلیوی طرح ریزی شد تا عواملی چون عملکرد کلیوی، میزان آسیب بافتی، استرس اکسیداتیو در مدت زمان 6، 24 و 48 ساعت ایسکمی رپرفیوژن بررسی شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو هفته مصرف امگا 3 قبل از ایسکمی عملکرد کلیوی را با کاهش کراتینین سرم، BUN، FENa و افزایش کلیرانس کراتینین بهبود داده و سبب کاهش استرس اکسیداتیو گردید. تعداد قابل توجهی از مطالعات اخیر بر اثر اسیدهای چرب امگا-3 در کاهش آسیب اکسیداتیو و تغییرات آپوپتوتیک بعد از ایسکمی تأکید کرده‌اند (12-15). در مطالعات دیگر نشان داده شده است که استفاده از DHA به مدت 21 روز قبل از ایسکمی مغز قادر است سلول‌های هیپوکامپ را در برابر آسیب اکسیداتیو و آپوپتوز ناشی از آن حفظ کند و از سوئی دیگر اختلال در یادگیری ناشی از ایسکمی را بهبود بخشد. یکی از مکانیسم‌های ذکر شده در کاهش استرس اکسیداتیو توسط اسیدهای چرب امگا 3، نقشی است که در کاهش آپوپتوز ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن دارد. ایسکمی منجر به هیپوکسی (کمبود اکسیژن در بافت) می‌شود، پروتئین‌های پرو آپوپتیک (Bax) از سیتوپلاسم به جدار میتوکندری تغییر مکان داده و سبب نفوذپذیری جدار خارجی میتوکندری می‌شود که خود منجر به آزاد شدن سیتوکروم c و شروع آپوپتوز می‌شود. نمازی و همکاران نشان دادند که اسیدهای چرب امگا 3 سبب افزایش تحمل بافت کلیوی نسبت به آسیب IR شده و از آپوپتوز توبولی بعد از ایسکمی جلوگیری می‌کند (16-18). پس از ایسکمی به علت افزایش استرس اکسیداتیو کلیه بر اثر IR فقدان فعالیت‌های SOD، CAT و کاهش Ccr به عنوان شاخص GFR، افزایش کراتینین سرم، BUN و FENa صورت می‌گیرد. این امر با مطالعه Yamanobe و همکاران هم مورد تأیید قرار گرفته است و نشان می‌دهد که حساسیت به ARF پس از 45 دقیقه از ایسکمی کلیوی در رت فاقد SOD کافی افزایش می‌یابد (19). استفاده از اسیدهای چرب امگا 3 در مطالعه حاضر اثر مثبتی را در کاهش استرس اکسیداتیو اعمال کرد. تصور بر این است که یک واکنش جهت کاهش استرس اکسیداتیو در ساعات اولیه

رپرفیوژن در رت‌های گروه امگا 3 اتفاق می‌افتد و آنزیم‌های CAT و SOD به ترتیب با تبدیل انیون سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن و تبدیل پراکسید هیدروژن به آب، برای محافظت در برابر رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو به هم کمک می‌کنند که این نشان دهنده فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی آنتی اکسیدانی در برابر آسیب اکسیداتیو است (20، 21). در مطالعه حاضر افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت‌های SOD و CAT به کاهش Ccr و افزایش Scr، BUN و FENa منجر شد. در رت‌های گروه امگا 3 سطوح فعالیت SOD و CAT طی دوره 48 ساعته رپرفیوژن بالاتر ماند و عملکرد کلیوی را بهبود یافت. بر اساس مطالعه Kim و همکاران، شاید افزایش فعالیت SOD پس از ایسکمی در گروه دریافت کننده امگا 3 باعث کاهش کراتینین پلاسما، پراکسید شدن لیپید و تولید هیدروژن پر اکساید در بافت شود. هرگونه عدم تعادل مابین تولید ROS و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی منجر به اکسید شدن جدار لیپیدی، پروتئین‌ها و DNA می‌شود (22، 23).

مطالعه دیگر در سال 2012 نشان داد امگا 3 به میزان 0/4 در روز به مدت 2 هفته باعث بهبود فیلتراسیون گلومرولی، کاهش اوره پلاسما و غلظت کراتینین در رت‌هایی می‌شود که هر دو کلیه آن‌ها تحت جراحی و ایسکمی قرار گرفته است (24).

مطالعه حاضر یک ارزیابی مقدماتی برای تعیین اثرات مفید اسیدهای چرب امگا-3 بر مسیرهای دخیل در آسیب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن کلیه بود. قطعاً با روشن شدن بیشتر این مسیرهای سیگنالی می‌توان به درمان‌های مولکولی و تغذیه‌ای مناسب برای کاهش شدت و درمان بیماری‌های مانند نارسایی حاد کلیه (ARF) کمک کرد.

در مطالعه حاضر مدلی از بیماری نارسایی حاد کلیوی توسط ایسکمی رپرفیوژن در رت‌های ویستار ایجاد شد و نشان داده شد که درمان با اسیدهای چرب امگا-3 (DHA-EPA) قادر است از اثرات مخرب ایسکمی رپرفیوژن بر کلیه بکاهد. در این راستا مسیرهای مولکولی و سیگنال‌های سلولی بسیاری ممکن است درگیر باشد از جمله می‌توان بر نقش آنتی اکسیدانی اسیدهای چرب امگا-3 (DHA-EPA) اشاره کرد، چرا که درمان با اسیدهای چرب امگا-3 (DHA-EPA) توانست فعالیت آنزیم کاتالاز و SOD را افزایش داده و از طرفی به کاهش Ccr و افزایش Scr، BUN و FENa منجر شد و همچنین باعث کاهش آسیب بافتی کلیه، تخریب سلولی و ورم توبولی گردید.

## • References

1. Hussein AA, El-Dken ZH, Barakat N, Abol-Enein H. Renal ischaemia/reperfusion injury: possible role of aquaporins. *Acta Physiol (Oxf)* 2012;204(3):308-16.2.
2. Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, et al. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 1999;30(9):1851-4.
3. McLennan PL, Owen AJ, Slee EL, Theiss ML. Myocardial function, ischaemia and n-3 polyunsaturated fatty acids: a membrane basis. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2007;8 Suppl 1:S15-8.
4. Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. *Neuroscience* 2002;109(2):231-41.
5. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11(3):301-8.
6. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998; 66(7):872-6.
7. Hassan IR, Gronert K. Acute changes in dietary omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids have a pronounced impact on survival following ischemic renal injury and formation of renoprotective docosahexaenoic acid-derived protectin D1. *J Immunol* 2009; 82(5):3223-32.
8. Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury. *Kidney* 2009;Int 80(1), 29-40.
9. Hock CE, Beck LD, Bodine RC, Reibel DK. Influence of dietary n-3 fatty acids on myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1990; 259(5 Pt 2):H1518-26.
10. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990;528(1):21-4.
11. Kosieradzki M, Rowinski W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc.* 2008 Dec;40(10):3279-88.
12. McClintock DS, Santore MT, Lee VY, Brunelle J, Budinger GR, Zong WX, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death. *Mol Cell Biol* 2002; 22(1), 94- 104.
13. Yu JH, Kang SG, Jung UY, Jun CH, Kim H. Effects of omega-3 fatty acids on apoptosis of human gastric epithelial cells exposed to silica-immobilized glucose oxidase. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1171,359-64.
14. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, Cerundolo L, Morris PJ, Fuggle SV. Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998; 66(7),872-6.
15. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002; 11(3),301-8.
16. Ajami M, Eghtesadi S, Razaz J. M.kalantari N, Habibey R, Nilforouhzadeh MA, et al. Expression of Bcl-2 and Bax after hippocampal ischemia in DHA + EPA treated rats. *Neurol Sci* 2011; 32 811-18.
17. Cao D, Li M, Xue R, Zheng W, Liu Z, Wang X. Chronic administration of ethyl docosahexaenoate decreases mortality and cerebral edema in ischemic gerbils. *Life Sci J* 2005;78(1):74-81.
18. Chatauret N, Thuillier R, Hauet T. Preservation strategies to reduce ischemic injury in kidney transplantation: pharmacological and genetic approaches. *Curr Opin Organ Transplant J.* 2011;16(2): 180-7.
19. Yamanobe T, Okada F, Iuchi Y, Onuma K, Tomita Y, Fujii J. Deterioration of ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in SOD1-deficient mice. *Free Radic Res* 2007; 41(2), 200-207.
20. Kim J., Park J.W., Park K.M. Increased superoxide formation induced by irradiation preconditioning triggers kidney resistance to ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296 F1202-F1211.
21. Kim J, Kil IS, Seok YM, Yang ES, Kim DK, Lim DG, et al. Orchiectomy attenuates post-ischemic oxidative stress and ischemia/reperfusion injury in mice. A role for manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 2006;281(29):20349-56.
22. O'Duffy AE, Bordelon YM, McLaughlin B. Killer proteases and little strokes--how the things that do not kill you make you stronger. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27(4):655-68.
23. An WS, Kim HJ, Cho KH, Vaziri ND. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;297(4):F895-903.
24. Ashtiyani SC, Najafi H, Kabirinia K, Vahedi E, Jamebozorky L. Oral omega-3 fatty acid for reduction of kidney dysfunction induced by reperfusion injury in rats. *Iran J Kidney Dis* 2012;6(4):275-83.

## Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in acute renal failure induced by ischemia reperfusion

Hajimiresmaiel J<sup>1</sup>, Davoodi H<sup>2</sup>, Namazi N<sup>3</sup>, Javedan Gh<sup>4</sup>, Pazoki-Toroudi H<sup>5</sup>, Ajami M<sup>\*6</sup>

1- Assistant Prof, Dept. of Cardiology, School of Medicine, Rasoul Akram Hospital, Iran university of medical sciences, Tehran, Iran

2- Assistant Prof. Dept. of Clinical Nutrition and Dietetic, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- M.Sc in Nutrition Sciences, International Branch, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Ph.D Student of Nutrition, Faculty of Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5- Assistant Prof, Physiology Research Centre, Iran University of Medical Science, Tehran, Iran

6- \*Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Food and Nutrition Policy and Planning Research, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email: Nutritionist80@gmail.com

Received 16 Oct, 2013

Accepted 11 Dec, 2013

**Background and Objectives:** Ischemia reperfusion (IR) occurs when the blood supply returns to the tissue after a period of ischemia, or lack of oxygen; it is a common cause of acute renal failure. The present study evaluated the effect of pretreatment with omega 3 fatty acids on ischemia reperfusion injury.

**Materials and Methods:** Right nephrectomy was performed on 81 male Wistar rats (255-300 g). The rats received either omega 3 fatty acids (DHA+EPA 200 mg/kg/d) or distilled water orally for 14 d prior to ischemia reperfusion (6, 24, 48 h reperfusion). Serum creatinine (SCr), BUN, creatinine clearance (CCr), and fractional excretion of sodium (FENa) were measured. Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and renal histological injury were also determined.

**Results:** SCr, BUN and FENa increased after 6-48 h of reperfusion ( $p < 0.01$ ). CAT and SOD activity decreased ( $p < 0.05$ ) in the IR group. DHA+EPA decreased SCr, BUN and FENa, ( $p < 0.05$  vs. IR) and increased CCr, CAT, and SOD activity ( $p < 0.05$  vs. IR) for 6-48 h after ischemia. IR induced mild (6 h,  $p < 0.05$ ) to severe (24-48 h,  $p < 0.01$ ) tissue damage. The tissue damage decreased significantly for the DHA+EPA group over the IR group ( $p < 0.05$  vs. IR; 24-48 h).

**Conclusion:** The results suggest that pre-ischemic exposure to DHA+EPA ameliorates oxidative stress and could improve kidney function by decreasing SCr, BUN, and FENa, and increasing CCr.

**Keywords:** Omega 3 fatty acids (DHA+EPA), Ischemia reperfusion, Oxidative stress, Acute renal failure