مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۳۸)

اثر نقش حفاظتی پیش‌شرطی‌سازی ایسکمیک دوردست در آسیب حاد کلیه ناشی از ایسکمی خون‌رسانی مجدد از طریق مسیر سیگنالینگ TLR-4 و TNF-α در رت

فیروزه غلامپور[۱]، جمشید روزبه[۲]، سحر جانفشان[۳]، لیلا ملک مکان[۲]، خجسته رحیمی‌جابری[۲]، زینب کریمی[۲*]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران،[۲]مرکز تحقیقات بیماری‌های کلیوی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [۳]گروه زیست شناسی، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، زرقان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۶/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸

چکیده:

آسیب حاد کلیه(Acute Kidney Injury: AKI) القاء شده به وسیله ایسکمی- خون‌رسانی مجدد(I/R Ischemic Reperfusion) کلیه، یک فرآیند التهابی معرفی می‌شود که در آن فاکتورهای متعدد التهابی نقش دارند. اخیراً یکی از راه‌های تعدیل التهاب در AKI، اعمال پیش‌شرطی‌سازی ایسکمیک دوردست(RIPerC) می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی نقش حفاظتی پیش‌شرطی‌سازی ایسکمیک دوردست در آسیب حاد کلیه ناشی از ایسکمی خون‌رسانی مجدد از طریق مسیر سیگنالینگ TLR-4 و TNF-α در رت بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال 1395 روی ۳۰ سر رت نر نژاد اسپراگ دالی با محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۲۸۰ گرم انجام شد. رت‌ها به سه گروه مساوی شاهد، ایسکمی خونرسانی مجدد(I/R) و ایسکمی خونرسانی مجدد همراه با پیش‌شرطی‌سازی ایسکمیک دوردست (RIPerC) تقسیم شدند. در این مطالعه، با بستن دو طرفه شریان و ورید کلیه به مدت ٤٥ دقیقه و٢٤ ساعت خون‌رسانی مجدد I/R القاء شد. مدل RIPerC شامل چهار سیکل پنج دقیقه‌ای(دو دقیقه بستن شریان فمورال چپ و سه دقیقه خون‌رسانی مجدد) در شروع ایسکمی کلیوی انجام شد. در انتهای دوره خون‌رسانی مجدد، نمونه ادرار، خون و نمونه‌های بافت کلیه جهت پژوهش‌های عملکردی، ساختاری و آنالیز مولکولی جمع‌آوری گردید. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارspss تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: ایسکمی- خون‌رسانی مجدد باعث آسیب بافتی و به دنبال آن اختلال در عملکرد کلیه شد که این اثر با کاهش کلیرانس کراتنین و افزایش دفع نسبی سدیم خودش را نشان داد. علاوه بر این، در گروه I/R سطح mRNA بافتی TLR-4 و TNF-α افزایش داشت که انجام RIPerC (در این گروه، در حین ایسکمی، ایسکمی و خون‌رسانی مجدد در شریان فمورال اعمال شد) همزمان با I/R سبب بهبود ساختار و عملکرد کلیه شد و میزان بیان TLR-4 و TNF-α کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: RIPerC سبب تخفیف در آسیب های عملکردی و ساختاری کلیه در برابر آسیب ناشی از ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه شد و احتمالاً این اثر حفاظتی از طریق مهار مسیر سیگنالینگ TLR-4 در کلیه اعمال شده است.

واژه‌های کلیدی: ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیوی، ریموت ایسکمیگ پر کاندیشنینگ، Toll like receptor-4،TNF-α ، التهاب کلیه، کلیرانس کراتنین

*نویسنده مسئول: **زینب کریمی**، شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات بیماری های کلیوی

Email: zkarimi@sums.ac.ir

مقدمه

ایسکمی ـ خون‌رسانی مجدد کلیوی با توجه به شدت جریان خون بعد از ایسکمی منجر به آسیب بافتی و عملکردی کلیه می‌شود. آسیب ایسکمیک کلیه یکی از مشکلات رایج در پیوند کلیه(۳ـ۱) و جراحی قلب(٤) است. در طی فاز ایسکمی، تخریب ATP با مهار کانال انتقالی در دو جهت مخالف و عملکرد کانال سدیم ـ پتاسیم ATPase(Na/K/ATPase) منجر به افزایش کلسیم سیستولیک و سدیم می‌شود. خون‌رسانی مجدد با افزایش کلسیم با القاء آپوپتوز از طریق فعال کردن آنزیم‌های داخل سلولی وابسته به کلسیم مانند فسفولیپاز A_2 سبب تشدید این موارد می‌شود(٥). پاتوژنز آسیب ناشی از ایسکمی- خونرسانی(I/R)[1] مجدد کلیوی مکانیسم‌های متعددی شامل فرآیندهای التهابی که به وسیله سیستم ایمنی ذاتی تسهیل می‌شوند را درگیر می‌کند. یکی از مولکول‌های مهم که به عنوان واسطه التهابی عمل می‌کند،(TLR_4)[2] است که در التهاب نقش اساسی دارد. شواهد زیادی وجود دارند که بیان می‌کنند TLR-4 در آسیب ناشی از ایسکمی خون‌رسانی مجدد به عنوان واسطه عمل می‌کند(٦). مولکول TLR-4 و لیگاندهایش در واکنش‌های پایین دست التهابی شامل فعال کردن سیتوکین‌های پیش التهابی و کموکاین‌هایی مانند TNF-α نقش دارند(۷). فعال شدن بیش از حد TLR-4 با آسیب ناشی از ایسکمی- خون‌رسانی مجدد ارتباط نزدیک دارد(۹ و۸). یکی از راه‌های مؤثر برای جلوگیری از آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی ـ خون‌رسانی مجدد RIPerC است. در RIPerC سیکل‌های متعدد ایسکمی و خون‌رسانی مجدد در طی ایسکمی سبب مقاومت و حفاظت بافت در مقابل I/R می‌شود. پژوهش‌های قبلی بیان کرده‌اند مکانیسم‌های متعددی شامل کاهش التهاب در بافت آسیب دیده ممکن است مسئول اثرات حفاظتی کلیوی RIPerC در مقابل IRI باشد(۱۰). به هرحال مکانیسم دقیق حفاظتی RIPerC شناخته شده نیست. مولکول TLR-4 به عنوان پیام گیر مورد توجه در بالادست مسیرهای سیگنالینگ چندگانه داخل سلولی مانند سیگنالینگ(TLR-4/TNF-α) در نظر گرفته می‌شود. محققان گزارش کرده‌اند که TNF-α یکی از مهم‌ترین سیتوکین‌های پیش التهابی است که به وسیله IR افزایش می‌یابد(۱۱). این افزایش در مدل‌های حیوانی I/R با کمبود TLR-4 تضعیف می‌شود(۱۱). به هرحال داده تحقیقاتی در ارتباط با این که آیا RIPerC در تغییرات بیان TLR-4 نقش دارد یا نه منتشر نشده است، لذا هدف از مطالعه حاضر تعیین و بررسی مکانیسم RIPerC با تمرکز بر روی سیگنالینگ TLR-4 در مدل حیوانی رت می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه حاضر، یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۹۵ بر روی ۳۰ سر رت نر سالم نژاد اسپراگ دالی در محدوده وزنی ۲۸۰ـ۲٦۰ گرم، تهیه شده از

1-Ischemia-Reperfusion(I/R)
2-Toll like receptor-4(TLR-4)

مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز، انجام شد. حیوانات چند روز قبل از انجام آزمایش‌ها، جهت تطبیق با شرایط جدید به اتاق حیوانات منتقل و در قفس‌های جداگانه در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و در درجه حرارت حدود ۲۵ـ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. رت‌ها به طور تصادفی در ۳ گروه مساوی(۱۰= تعداد) شاهد، گروه I/R و RIPerC مورد آزمایش قرار گرفتند.

قبل از انجام جراحی حیوان‌ها با سدیم باربیتال(۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تزریق داخل صفاقی) بیهوش شدند و جهت حفظ دمای بدن حیوان بر روی ۱±۳۷ درجه سانتی‌گراد، جراحی بر روی میز جراحی گرمایشی انجام شد. در هر سه گروه شکم حیوان از ناحیه خط وسط باز، به طوری که شریان و ورید کلیه کاملاً در معرض دید قرار گرفت. در ادامه با میکروسکوپ جراحی شریان و ورید هر دو کلیه کاملاً از بافت‌های همبند اطراف خود پاکسازی و از یکدیگر جدا شدند. در گروه شاهد فقط شکم باز شد و شریان و ورید کلیه بسته نشدند، در گروه I/R شریان و ورید کلیوی به مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از کلمپ بسته شدند و فرآیند ایسکمی در موش انجام شد و در گروه RIPerC شریان رانی چپ طی چهار سیکل دو دقیقه ایسکمی شده و سه دقیقه خون‌رسانی مجدد در شروع ایسکمی کلیوی انجام شد. در پایان جراحی، رت‌ها در قفس متابولیک قرار داده شده و ادرار آن‌ها در مدت ۲۴ ساعت جمع‌آوری شد. بعد از دوره خون‌رسانی مجدد ۲۴ ساعته، رت‌ها بیهوش شده و نمونه‌های خون آن‌ها از ناحیه دم گرفته شد و بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ گردید و پلاسمای آن جهت اندازه‌گیری پارامترهای کلیوی در ۲۰ـ نگهداری شد. کلیه‌ها از بدن حیوان خارج شد و بلافاصله وزن شدند. کلیه راست برای بررسی‌های مولکولی در نیتروژن مایع و بعد در ۸۰ـ قرار داده شد و کلیه چپ در فرمالین ۱۰ درصد برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین نگهداری شد.

بعد از ۲۴ ساعت دوره خون‌رسانی مجدد، نمونه ادرار جمع‌آوری شد. با داشتن حجم ادرار ۲۴ ساعته، میزان جریان ادرار در واحد زمان(میکرولیتر/دقیقه) محاسبه شد. کراتنین نمونه‌های پلاسما و ادرار به وسیله دستگاه اتوآنالیزور(Prestige, Biolis 24I, Japan) اندازه‌گیری شد. با داشتن کراتنین پلاسما و ادرار و حجم ادرار در واحد زمان محاسبه کلیرانس کراتین(C_{cr}) انجام شد.(۱۲).

سدیم نمونه‌های پلاسما و ادرار به وسیله فوتومتر(Jenway,U.K.) اندازه‌گیری و برای دفع نسبی یون سدیم(FE_{Na}) استفاده شد(۱۲). فیلتراسیون کراتنین و دفع نسبی یون سدیم به ترتیب به عنوان شاخص‌های عملکرد گلومرول کلیوی و تخریب توبولار به کار رفت(۱۳).

کل RNA بافت کلیه برای هر نمونه با استفاده از کیت استخراج شرکت سیناژن جداسازی شد. برای تعیین خلوص، یکپارچگی و غلظت RNA های استخراج

شده، چگالی بهینه ۲۶۰/۲۸۰ و الکتروفورز ژل آگارز(۱ درصد) بررسی شد. سپس کل RNA با استفاده از کیت سنتز DNA مکمل (cDNA) شرکت فرمنتاز به مولکولهای دو رشته ای cDNA تبدیل شد. در مرحله بعد جهت تکثیر مولکول‌های cDNA، پرایمرهای ژن های مورد مطالعه طراحی شد که در جدول ۱ ارایه شده است. برای اندزه‌گیری میزان بیان مولکول های RNA مورد مطالعه، از کیت سایبرگرین شرکت امپلیکون استفاده شد و براساس دستور العمل کیت محلول های مورد نظر آماده شد؛ سپس با استفاده از دستگاه ریل تایم پی سی آر(RT-PCR) شرکت اپلاید بیوسیستم مدل استپ وان و به روش سایبرگرین بر اسا س برنامه ارائه شده در جدول ۲ و با استفاده ار بتا ۲ میکروگلوبین ریل تایم انجام شد بعد از هر دور انجام RT-PCR، منحنی ذوب و ژل الکتروفوررز نمونه‌ها جهت تأیید اتصال اختصاصی ژن‌های هدف بررسی شد. از روی منحنی‌های تکثیر ۱۵۵ نمونه مختلف میزان حد آستانه نمونه‌ها به دست آمد که با میزان حد آستانه ژن کنترل داخلی برای هر نمونه عادی‌سازی شدند و در نهایت بیان ژن‌های مربوطه با استفاده از روش لیواک محاسبه شد.

برای مطالعه هیستوپاتولوژیک نمونه کلیه چپ در فرمالین ۱۰ درصد استفاده شد. اسلایدهای بافتی تهیه و به وسیله هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شد. به صورت تصادفی از هر نمونه رنگ‌آمیزی شده به وسیله میکروسکوپ نوری ده تصویر بدون هم‌پوشانی تهیه شد. با بررسی اتساع کپسول بومن، ریزش لبه برسی سلول‌های اپیتلیال، نکروز سلول‌های اپیتلیال، تشکیل کست‌های توبولی، عدم فیلتراسیون لنفوسیت‌ها و اتساع لومن عروق مدولای با تجمعی از گلبول‌های قرمز تغییرات هیستوپاتولوژیک ارزیابی شد. مقاطع از صفر تا پنج رتبه‌بندی شدند؛ صفر: بدون آسیب، ۱: کمتر از ۲۰ درصد آسیب، ۲: بین ۲۰ تا ۴۰ درصد آسیب، ۳: بین ۴۰ تا ۶۰ درصد آسیب، ٤: بین ۶۰ تا ۸۰ درصد آسیب و ٥: بیش از ۸۰ درصد آسیب. مجموع تمام رتبه عددی هر گروه به عنوان رتبه کل تغییرات هیستوپاتولوژیک در گروه در نظر گرفته شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آنالیز واریانس، تست توکی، کروس کالوالیس و من ویتنی تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی داری همواره کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

تغییرات عملکردی کلیه القا شده به وسیله I/R با انجام RIPerC تعدیل شد، همان‌طور که جدول۲ نشان می‌دهد، غلظت پلاسمایی کراتینین(Cr) و نیتروژن ـ اوره خون(BUN) در گروه I/R نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشتند. همچنین کلیرانس کراتنین(C_{cr}) و دفع نسبی سدیم (FE_{Na}) نسبت به گروه شاهد به ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری داشتند. انجام RIPerC سبب کاهش Cr و BUN و کاهش مقادیر C_{cr} و FE_{Na} در گروه I/R شد. تغییرات بیان-TLR

4و TNF-α در بافت کلیه القا شده به وسیله I/R با انجام RIPerC تعدیل شد.

شکل ۱ نشان می‌دهد که سطح بیان TLR-4 در بافت کلیه در گروه I/R نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌دار داشته است. انجام RIPerC سبب کاهش بیان TLR-4 در بافت کلیه می‌شود(شکل A). علاوه بر این، در گروه I/R، بیان TNF-α در بافت کلیه به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت(شکلB). بیان TNF-α در بافت کلیه در گروه RIPerC در مقایسه با گروه I/R به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد(شکل۱).

در گروه شاهد، ساختار توبولی و عروقی ناحیه کورتکس بافت کلیه نرمال بود(تصویرC۱)، اما بررسی ناحیه کورتکس در کلیه ایسکمی شده گروه‌های I/R و IR+REM، آسیب‌های توبولی و عروقی بافت کلیه را به صورت افزایش اندازه فضای بومن (پیکان سفید)، نکروز سلولی و ریزش(پیکان سیاه) آنها به داخل توبول پروگزیمال(CPT)[۱]، بخش ضخیم صعودی لوپ هنله(TAL)[۲] را نشان داد(تصویرA۱ وB۱)؛ به طوری که درجه شدت تمامی این آسیب‌ها در هر دو گروه نسبت به گروه شاهد و گروه IR نسبت به گروه IR+REM(همگی p<۰/۰۱) بالاتر بودند. علاوه بر این، در مدولای خارجی(OM)[۳] کلیه ایسکمی شده گروه‌های I/R و IR+REM، (تصویرA۲ و B۲)، نکروز سلولی و ریزش آنها به داخل لومن(پیکان سفید) در بخش مستقیم توبول پروگزیمال و TAL و همچنین احتقان عروقی(پیکان سیاه) با شدت بیشتر از گروه شاهد (تصویرC۲) مشاهده شد(همگی p<۰/۰۱). شدت تمامی این آسیب‌ها در کلیه ایسکمی شده گروه IRبیشتر از گروه IR+REM بود(همگی p<۰/۰۱).

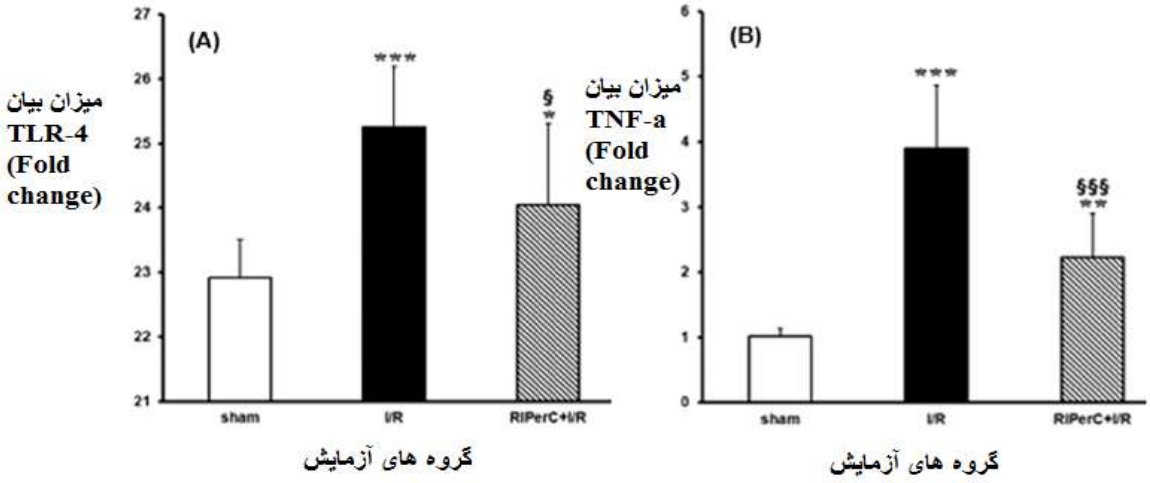
جدول۱: توالی پرایمر ژن های مورد مطالعه

نام ژن	توالی پرایمرها	طول محصول (جفت باز)
TNF-α	F: 5'- ATGGGCTCCCTCTCATCAGT-3' R: 5'- GCTTGGTGGTTTGCTACGACG-3'	۱۰۶
TLR4	F: 5'- TATCCAGAGCCGTTGGTGTATCT-3 R: 5'- AATGAAGATGATGCCAGAGCG-3'	۸۵
B2m	F: 5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3' R: 5'- ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	۲۴۴

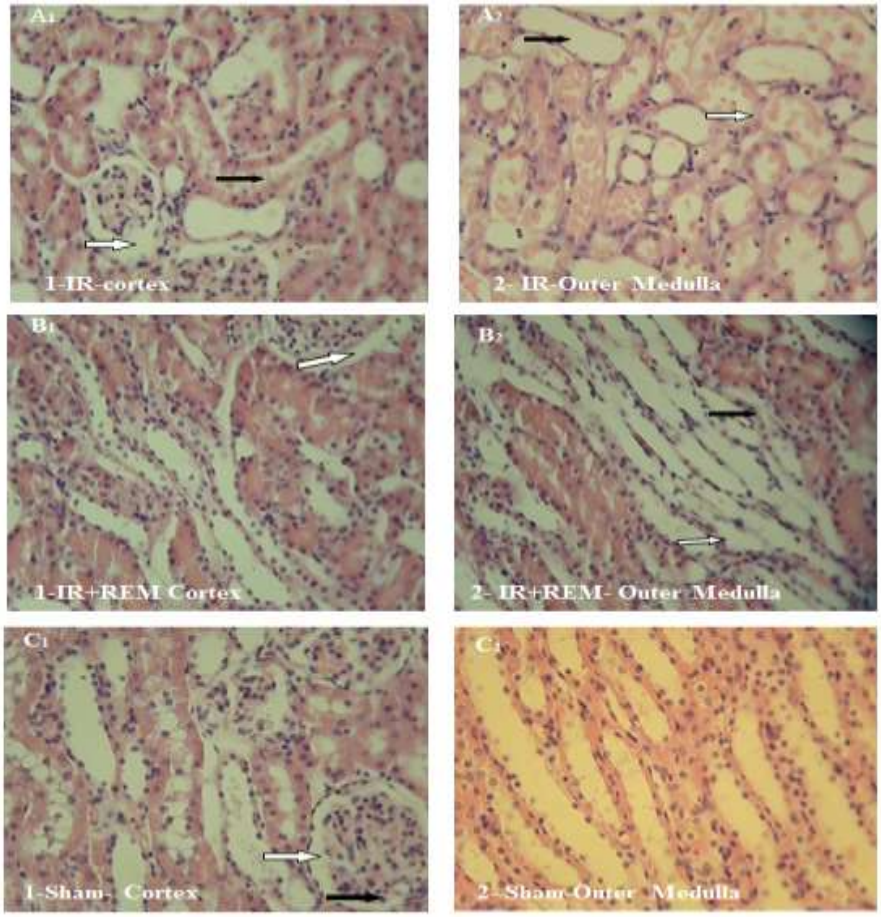
جدول ۲: تغیرات مقادیر پارامترهای عملکردی کلیه در رت های تحت ایسکمی دو طرفه کلیه با و بدون پیش شرطی‌سازی ایسکمیک دوردست

متغیرها گروه‌های آزمایش	غلظت پلاسمایی کراتینین (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	نیتروژن ـ اوره خون (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	کلیرانس کراتنین (میکرولیتر بر دقیقه بر کیلوگرم وزن بدن)	دفع نسبی سدیم(درصد)
شاهد	۰/۵۵±۰/۱۸	۳/۷۷±۲۲/۷	۵۵۰/۳۵±۱۱۲/۲٤	۰/۷٤±۰/۱۲
I/R	***۱/۷۷±۰/۳۵	***٤۸/۲±۱۰/۲	***۱۵۰/۸۵±۵۰/٦۵	***۳/۳۵±۰/۹
I/R+RIPerC	×××۱/۱۱±۰/۲۱ϕϕϕ	**۳۰/۸±۵/۳۲ϕϕϕ	**۳۵۰/٤۵±۱۰۰/٦۷ϕϕϕ	۱/٦۲±۰/۳۲

p<۰/۰۱ **، p<۰/۰۰۱ ***، در مقایسه با گروه شاهد؛ ϕϕp<۰/۰۱، ϕϕϕp<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه I/R



شکل ۱: تأثیر RIPerC بر سطح بیان ژن (A) TLR-4 و (B) TNF-α در بافت کلیه. p<۰/۰۰۱ *، p<۰/۰۱ **، p<۰/۰۵ * در مقایسه با گروه شاهد؛ §§§p<۰/۰۰۱ ، §§p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه I/R**



شکل۲: تغییرات هیستولوژی گروه های I/R و IR+REM در ناحیه کورتکس و مدولای خارجی بافت کلیه نسبت به گروه شاهد، مطالعات میکروسکوپی(بزرگنمایی400)نشان می دهد. ایسکمی ـ خون‌رسانی مجدد باعث آسیب ساختاری و توبولی در ناحیه کورتکس و مدولای خارجی کلیه شده است(A1 و A2). اعمال پیش‌شرطی‌سازی ایسکمیک دوردست توانسته است تا حدودی شدت اسیب ناشی از ایسکمی کلیه را کاهش دهد(B1 و B2).

بحث

AKI القاء شده به وسیله I/R یک فرآیند التهابی می‌باشد که در آن فاکتورهای متعدد التهابی باعث شروع و گسترش آسیب سلولی در توبول‌ها، فضای میان بافتی و اندوتلیوم عروقی می‌شوند و باعث ایجاد اختلالات عملکردی کلیه می‌شوند. در زمان ایسکمی، هیپوکسی مستقیما از طریق تخلیه انرژی و افزایش ROS سبب آسیب سلول‌های اپیتلیال توبولی می‌شود و فرآوردهای آزاد شده از سلول اپیتلیال آسیب دیده مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی را برای آزاد شدن سیتوکین‌ها و کموکین‌ها فعال می‌کنند(۳و۲)، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی نقش حفاظتی پیش‌شرطی‌سازی ایسکمیک دور دست در آسیب حاد کلیه ناشی از ایسکمی‌خون‌رسانی مجدد از طریق مسیر سیگنالینگ TLR-4 و TNF-α در رت بود.

پژوهش‌ها نشان داده است که در نتیجه I/R بیان TLR-4 در بافت کلیه افزایش یافته و سبب پاسخ التهابی و آسیب بیشتر بافت کلیه می‌شود(۱٤). در این مطالعه مدل I/R برای بررسی نقش مسیر سیگنالینگ TLR-4 در مقابل اثرات حفاظتی RIPerC در مدل حیوانی، در رت القا شد. نتایج نشان داد که RIPerC با سرکوب پاسخ‌های التهابی سبب کاهش تخریب ساختاری و عملکردی کلیه در اثر ایسکمی می‌شود. القاء RIPerC سطح mRNA فاکتور التهابی TLR-4 کاهش می‌دهد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که RIPerC با مهار فعالیت TLR-4 آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی را کاهش می‌دهد.

یکی از جدیدترین تکنیک‌های مؤثر که آسیب ناشی از I/R را در بافت کلیه و کبد کاهش می‌دهد RIPerC است(۱۵). مکانیسم حفاظتی کلیه به وسیله RIPerC پیچیده است و به طور کامل شناخته شده نیست. دو مورد از مهم‌ترین مکانیسم‌های مربوط به RIPerC کاهش استرس اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی می‌باشد(۳).

احتمالاً کاهش جریان خون(که با کاهش تعداد گلبول‌های قرمز در گلومرول‌ها مشخص شد)، نشت برگشتی و افزایش فشار کپسول بومن مسئول کاهش کراتنین به عنوان شاخص GFR در نتیجه ایسکمی در گروه I/R بوده است(۱۷ و۱٦). سیگنالینگ TLR-4 با فعال کردن واکنش‌های التهابی نقش اساسی در آسیب کلیوی ناشی از I/R دارد(۱۸). بیان بیش از حد TLR-4 در نمونه‌های بافت کلیه گروه I/R احتمالاً مهم‌ترین دلیل التهاب است. در واقع پالسکن و همکاران با به کار گیری TLR-4 در موش نقش حفاظتی آن را در عملکرد کلیه، تولید سیتوکین‌ها و عدم فیلتراسیون گرانولوسیت‌ها نشان دادند(۱۹). افزایش بیان TLR-4 در ایسکمی کلیوی در رت بررسی شد(۲۰) و نشان داده شد که فعالیت TLR-4 به عنوان واسطه در کاهش عملکرد کلیه فرآیند التهاب را شدت می‌دهد. در قلب، فعالیت TLR-4 سبب افزایش استرس سلولی و التهاب در اثر دیابت و ایسکمی می‌شود(۲۱). اثر حفاظتی ایسکمی پیش شرطی سازی دوردست بر بیماری‌های حاد کلیوی، بیماری‌های کلیوی ناشی از دیابت با مهار مسیرهای التهابی TLR-4/NF- κB/NLRP3 میانجی‌گری

می‌شود(۲۲). در مطالعه حاضر، تصاویر میکروسکوپ نوری نشان داد در گروه I/R لبه برسی تخریب شده و سلول‌های اپی‌تلیالی در لومن توبول‌های پروگزیمال قشری نازک شده است که این امر منجر به اختلال در فرآیند جذب در این توبول‌ها گردیده است. علاوه بر این موارد نکروز توبولی شدید در بخش مستقیم توبول نزدیک و توبول ضخیم صعودی بخش مدولا در گروه I/R مشاهده شد که با افزایش FE_{Na} در این گروه مرتبط است. در این پژوهش بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داد که RIPerC سبب کاهش تغییرات مورفولوژیک شامل تخریب براش بوردرها، نازک شدن سلول‌های اپی‌تلیالی لومن توبول‌های پروگزیمال، عدم فیلتراسیون لوکوسیت‌ها، چسبندگی عروق و تشکیل کست درمدولا در مقایسه با گروه I/R شد. پژوهش‌های دیگر نشان داد که کاهش TLR-4 در موش منجر به کاهش آسیب ناشی I/R با تعدیل آسیب توبولار، کاهش سیتوکین‌های پیش‌التهابی و کاهش تجمع لوکوسیت‌ها در مقایسه با گروه کنترل شد(۹). بنابراین، این شواهد نشان می‌دهد RIPerC تولید TLR-4 کاهش می‌دهد و سبب حفاظت بافت در مقابل آسیب ناشی از I/R می شود. مطالعه حاضر همچنین نشان می‌دهد سرکوب فرآیند التهاب که به وسیله RIPerC صورت می‌گیرد از طریق مهار مسیر سیگنالینگ TLR-4 عمل می‌کند. روش‌های قابل ذکر دیگر در ارتباط با عملکرد حفاظتی RIPerC مربوط به تغییرات سلول‌های سیستم ایمنی و کاهش سیتوکین‌های التهابی می‌باشد(۲۵-۲۳). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که RIPerC احتمالاً سبب القاء تغییرات عملکردی در لوکوسیت‌ها می‌شود که با یک الگوی تعدیل شده‌ای از بیان و عملکرد ژن‌ها در بافت کلیه ایسکمیک نفوذ می‌کند.

محدودیت این طرح بالا بودن هزینه آزمایش می باشد. پیشنهاد، بررسی بیشتر مسیر سیگنالینگ مربوط به TLR-S می باشد.

نتیجه‌گیری

RIPerC آسیب بافت کلیوی را کاهش می‌دهد، احتمالاً مهار پاسخ‌های التهابی ایجاد شده در نتیجه I/R می‌شود. همچنین مشخص شد که کاهش GFR و بازجذب سدیم کاهش پیدا کرد و در نتیجه افزایش غلظت پلاسمایی کراتینین و نیتروژن اوره تضعیف شد. همچنین ایسکمی دوردست توانست با کاهش بیان TLR-4 و به دنبال آن تضعیف مسی سیگنالینگ داخل سلولی TNF-α اسیب های ساختاری و عملکردی کلیه را بهبود ببخشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از طرح غیر پایان نامه ای با کد اخلاق ۹۵-۰۱-۱۸-۱۲۰۰۰ دانشگاه علوم پزشکی شیراز می‌باشد، که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد.

REFERENCES

1.Rabb H, Matthew DG, Dianne BM, Sundararaman S, Peter P, Mitchell H. et al. Inflammation in AKI: current understanding, key questions, and knowledge gaps. Journal of the American Society of Nephrology 2016; 27(2): 371-9.
2.Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. Journal of Renal injury Prevention 2015; 4(2): 20.
3.Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. The Journal of Clinical Investigation 2011; 121(11): 4210-21.
4.Mulay SR, Holderied A, Kumar SV, Anders HJ. Targeting inflammation in so-called acute kidney injury. Elsevier: In Seminars in Nephrology; 2016.
5.Huen SC, Cantley LG. Macrophages in renal injury and repair. Annual Review of Physiology 2017; 79: 449-69.
6.Shimamoto A, Pohlman HT, Shin S, Tarukawa T, Takao M, Shimpo H. et al. Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury. The Annals of Thoracic Surgery 2006; 82(6): 2017-23.
7.Liu Q, Ding JL. The molecular mechanisms of TLR4 signaling cooperation in cytokine regulation. Immunology and Cell Biology 2016; 94(6): 538-42.
8.Liu M, Gu M, Xu D, Lv Q, Zhang W, Wu Y. Protective effects of Toll-like receptor 4 inhibitor eritoran on renal ischemia-reperfusion injury. In Transplantation Proceedings: 2010, Elsevier.
9.Qi M, Zheng L, Qi Y, Han X, Xu Y, Xu L, et al. Dioscin attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting the TLR4/MyD88 signaling pathway via up-regulation of HSP70. Pharmacological Research 2015; 100: 341-52.
10. Jiang BT, Chen QZ, Guo ZH, Zou W, Chen X, Zha WL. Ischemic post-conditioning attenuates renal ischemic reperfusion injury via down-regulation of toll-like receptor 4 in diabetic rats. Renal Failure 2016; 38(9): 1425-31.
11.Wu H, Ma J, Wang P, Corpuz T.M, Panchapakesan U, Wyburn KR, et al. HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. Journal of the American Society of Nephrology 2010; 21(11): 1878-90.
12.Karimi Z, Ketabchi F, Alebrahimdehkordi N, Fatemikia H, Owji SM, Moosavi SM. Renal ischemia/reperfusion against nephrectomy for induction of acute lung injury in rats. Renal Failure 2016; 38(9): 1503-15.
13.Chatterjee PK, Patel NSA, Cuzzocrea S, Brown PAJ, Stewart KN, Mota-Filipe H, et al. The cyclopentenone prostaglandin 15-deoxy-Δ12, 14-prostaglandin J2 ameliorates ischemic acute renal failure. Cardiovascular Research 2004; 61(3): 630-43.
14.Bergler T, Hoffmann U, Bergler E, Jung B, Banas MC, Reinhold SW, et al. Toll-like receptor 4 in experimental kidney transplantation: early mediator of endogenous danger signals. Nephron Experimental Nephrology 2012; 121(3-4): e59-70.
15.Costa FL, Yamaki VN, Gonçalves TB, Coelho JV, Percário S, Brito MV. Combined remote ischemic perconditioning and local postconditioning on liver ischemia–reperfusion injury. Journal of Surgical Research 2014; 192(1): 98-102.
16.Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW. Pathophysiology of acute renal failure. Journal of Nephrology 1999; 12: S142-51.
17.Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. The Journal of Clinical Investigation 2004; 114(1): 5-14.
18.Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews Immunology 2004; 4(7): 499.
19.Pulskens WP, Teske GJ, Butter ML, Roelofs JJ, Poll TVD ,Florquin S, et al. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. PloS One 2008; 3(10): e3596.
20.Jiang H, Chen R, Xue S, Zhu H, Sun X, Sun X Protective effects of three remote ischemic conditioning procedures against renal ischemic/reperfusion injury in rat kidneys: a comparative study. Irish Journal of Medical Science (1971) 2015; 184(3): 647-53.
21.Dong B, Qi D, Yang L, Huang Y, Xiao X, Tai N, et al. TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 2012; 303(6): H732-42.
22.Sun Z , Ma Y, Chen F, Wang S, Chen B, Shi J. Artesunate ameliorates high glucose-induced rat glomerular mesangial cell injury by suppressing the TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway. Chemico-Biological Interactions 2018; 293: 11-9.

23.Kim YH, Yoon D, Kim J, Lee LH, Lim CH. Effect of remote ischemic conditioning on systemic inflammatory response and survival rate in LPS-induced sepsis model: 12AP4-10. European Journal of Anaesthesiology(EJA) 2014; 31: 206.
24.Joseph B, Khalil M, Hashmi A, Hecker L, Kulvatunyou N, Tang A, et al. Survival benefits of remote ischemic conditioning in sepsis. Journal of Surgical Research 2017; 213: 131-7.
25.Dezfulian C, Taft M, Corey C, Hill G, Krehel N, Rittenberger JC, et al. Biochemical signaling by remote ischemic conditioning of the arm versus thigh: Is one raise of the cuff enough? Redox Biology 2017; 12: 491-8.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Effect of the Protective Role of Long-Term Ischemic Preconditioning on Acute Renal Impairment Due to Re-Ischemic Resection Through TLR-4 and TNF-α Signaling Pathway in Rats

Gholampour F[1], Roozbeh J[2], Janfashan S[3], Malek Mahal L[2], Rahimi Jaberi K[2], Karimi Z[2*]

[1]Department of Biology, Shiraz University, Shiraz, Iran, [2]Clinical Disease Research Centers, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [3]Department of Biology, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran

Received: 28 Aug 2019 Accepted: 17 Feb 2020

Abstract

Background & aim: Acute Kidney Injury (AKI) is an inflammatory process in which multiple inflammatory factors are involved. Recently, one of the ways to alleviate inflammation in AKI is to apply pre-conditioned ischemic remote control (RIPerC). The aim of the present study was to determine and investigate the protective role of long-term ischemic preconditioning in acute injury of all ischemia due to resection through the TLR-4 and TNF-α signaling pathways in the rat.

Methods: The present experimental study was conducted in 2016 on 30 male rats of Sprag Dolly breed with a weight range of 250 to 280 grams. Ratings were divided into three equal groups of control, re-ischemic resection (I / R) and re-ischemic resection with long-term ischemic preconditioning (RIPerC) predisposition. In this study, I / R re-bleeding was observed with bilateral closure of the artery and renal vein for 45 minutes and 24 hours. The RIPerC model consisted of four five-minute cycles (two minutes for closing the left femoral artery and three minutes for re-bleeding) at the onset of ischemic-renal failure. At the end of the resuscitation period, urine, blood, and kidney tissue samples were collected for functional, structural, and molecular analysis. The collected data were analyzed using SPSS software.

Results: Ischemia-reperfusion caused tissue damage and subsequently impaired renal function, which was demonstrated by a decrease in creatinine clearance and an increase in its relative sodium excretion. In addition, in the I/R group, mRNA level of TLR-4 and TNF-α in tissue increased, whereas RIPerC (in this group, during ischemia, ischemia, and reperfusion in the femoral artery was done) simultaneously with I/R improved kidney structure and function and decreased expression of TLR-4 and TNF-α.

Conclusion: RIPerC protected the kidney against ischemia-reperfusion-induced kidney injury and probably this protective effect was exerted by inhibition of TLR-4 signaling pathway in the kidney.

Keywords: Ischemia-renal reperfusion, Remote ischemic per conditioning, Toll like receptor-4, TNF-α, kidney inflammation, creatinine clearance

[*]**Corresponding author: Karimi Z,** Clinical Disease Research Centers, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: zkarimi@sums.ac.ir

Please cite this article as follows:
Gholampour F, Roozbeh J, Janfashan S, Malek Mahal L, Rahimi Jaberi K, Karimi Z. Effect of the Protective Role of Long-Term Ischemic Preconditioning on Acute Renal Impairment Due to Re-Ischemic Resection Through TLR-4 and TNF-α Signaling Pathway in Rats. Armaghane-danesh 2020; 25(1): 12-22.