

اثر اریتروپویتین نو ترکیب بر سطح فعالیت سرمی آنزیم پاراکسوناز، آنتی اکسیدان تام و پراکسیداسیون لیپیدی در موش صحرایی نر

دکتر امیر قربانی حق جو^۱، دکتر نادره رشتچی زاده^{۲*}، جابر هاشم زاده^۳، مرتضی قاری قرآن^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۰۹

چکیده

پیش زمینه و هدف: اریتروپویتین (EPO) هورمونی گلیکوپروتئینی است که در پاسخ به هیپوکسی از بافت کلیوی ترشح می شود و باعث افزایش در تولید گلبول های قرمز خون می شود. هدف مطالعه حاضر ارزیابی تاثیرات اریتروپویتین نو ترکیب (r-EPO) بر سطح فعالیت سرمی آنزیم پاراکسوناز (PON)، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC) و پراکسیداسیون لیپیدی در رت است.

مواد و روش کار: ۳۰ رأس موش صحرایی نر از نژاد ویستار به صورت غیر انتخابی به سه گروه تقسیم شدند. به گروه A (r-EPO دوز بالا)، به گروه B (r-EPO دوز پایین) به ترتیب به مدت یک و چهار هفته به طور داخل صفاقی تزریق شد و به گروه C (کنترل) در حجم مساوی سالی نر مال به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. پس از پایان هفت روز در گروه A و C اقدام به خون گیری و تهیه سرم از رت ها کردیم. همین روش کار را در مورد گروه B نیز انجام دادیم. سپس فاکتورهای تغییر فعالیت آنزیم های AE-PON، تغییرات مقدار سرمی مالون دی آلدئید (MDA)، TAC و پروفیل لیپیدی در سرم رت ها مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت تغییرات صورت گرفته مابین سه گروه با نرم افزار SPSS 16.0 مورد آنالیز آماری قرار گرفت.

یافته ها: بررسی نتایج حاصل از تغییرات صورت گرفته در گروه های دریافت کننده دوزهای بالا و پایین اریتروپویتین در مقایسه با گروه کنترل حاکی از افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در فعالیت آنزیمی پاراکسوناز (به ترتیب با $P=0.026$ و $P=0.033$)، فعالیت آنزیمی آریل استراز (به ترتیب با $P=0.023$ و $P=0.033$) و مقدار سرمی TAC (به ترتیب با $P=0.008$ و $P=0.004$) و همچنین کاهش معنی داری در غلظت سرمی مالون دی آلدئید (به ترتیب با $P=0.002$ و $P=0.020$) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی بود. بعلاوه در راستای بررسی همبستگی میان فاکتورهای مورد سنجش در گروه های دریافت کننده دوزهای بالا و پایین اریتروپویتین، بین فعالیت PON و AE (به ترتیب با $r=0.770$ و $r=0.830$) و نیز بین فعالیت PON و سطح سرمی TAC (به ترتیب با $r=0.758$ و $r=0.774$) همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد. بعلاوه بین فعالیت PON و غلظت سرمی MDA (به ترتیب با $r=0.717$ و $r=0.778$) و همچنین بین مقادیر سرمی MDA و TAC (به ترتیب با $r=0.667$ و $r=0.708$) همبستگی معکوس و معنی دار مشاهده گردید.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر r-EPO دارای ویژگی های آنتی اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی است. بنابراین در شرایط استرس های اکسیداتیو می تواند مورد استفاده قرار گیرد. علیرغم هزینه گران قیمت استفاده از دوز بالای r-EPO، تأثیرات آن مشابه دوز پایین r-EPO بود. بنابراین مطالعه نتایج بررسی حاضر استفاده از دوز بالای r-EPO را پیشنهاد نمی کند.

کلید واژه ها: اریتروپویتین نو ترکیب (r-EPO)، مالون دی آلدئید (MDA)، پاراکسوناز (PON)، آریل استراز (AE)، ظرفیت آنتی اکسیدان تام (TAC)، لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL-C)

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و سوم، شماره سوم، ص ۲۹۰-۲۸۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۱

آدرس مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۴۴۲۶۰۷۸-۴۱۱

Email: rashtchizadeh@yahoo.com

مقدمه

محل سنتز این هورمون در سلول های کلیوی و محل اثر آن

بر روی کبد، مغز و رحم تشخیص داده شده است (۲). EPO به طور عمده (۹۰٪) از بافت بینابینی پره توبولار کلیه ها ترشح

اریتروپویتین (EPO) هورمونی گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۳۰/۴ کیلو دالتون و دارای ۱۶۵ اسید آمینه است (۱).

^۱ دانشیار بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی

^۲ استاد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی (نویسنده مسئول)

^۳ کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی

^۴ کارشناس ارشد بیوشیمی دانشگاه رازی کرمانشاه

می شود و میانجی اصلی پاسخ فیزیولوژیک بدن به شرایط هیپوکسی مزمن می باشد. این هورمون عملکردی سیستمیک دارد و منجر به افزایش تولید گلبول های قرمز خون از طریق اتصال به گیرنده های خود بر روی سلول های پیش ساز RBC (رده اریتروئید) در مغز استخوان می گردد. مصرف EPO در کم خونی ناشی از کموتراپی، کم خونی ناشی از عفونت HIV و آنمی ناشی از نارسایی مزمن کلیه (CRD) مورد تأیید است (۳). اریتروپویتز توسط یک سیستم فیدبک دقیق و از طریق یک گیرنده در کلیه ها کنترل می شود. این گیرنده میزان اکسیژن رسیده به بافت کلیه را درک کرده و باعث تنظیم ترشح EPO می شود. امروزه مکانیسم این گیرنده در سطح مولکولی شناخته شده است. در طی هیپوکسی فاکتور نسخه برداری القاء شده توسط هیپوکسی ژن های قابل القاء توسط هیپوکسی از جمله EPO، HIF-7، VEGF (Vascular endothelial GF) می شود.

مطالعات گوناگون بازگوکننده اثرات EPO به عنوان یک سیتوکاین چند کاره است که علاوه بر اثر روی افزایش تولید RBC، منجر به محافظت بافت های نظیر قلب، مغز و کلیه در برابر آسیب ناشی از ایسکمی می شود (۴). EPO نه تنها یک هورمون سیستمیک است، بلکه در بسیاری از بافت های بدن در پاسخ به استرس فیزیکی و استرس متابولیک ترشح می شود. این ماده می تواند بعد از ترشح به صورت اتوکراین و پاراکراین اثر گذاشته و مقاومت به ایسکمی را افزایش دهد و به صورت اختصاصی از اثرات تخریبی TNF- α و بقیه عوامل سیتوکاینی در قلب، مغز و کلیه و سایر بافت ها جلوگیری نماید. از طرفی نشان داده شده است که تولید موضعی EPO به دنبال صدمات و استرس مهار می شود و بنابراین مقاومت بافت نسبت به ایسکمی کم خواهد شد. به این ترتیب تزریق آگزوژن EPO در موارد آسیب می تواند یک درمان موفق در جلوگیری از آسیب ایسکمیک باشد که نیازمند ارزیابی پره کلینیکال است (۵). مطالعات حیوانی مشخص کرد درمان با EPO در طی آسیب ایسکمی قلب منجر به کاهش حجم انفارکتوس و میزان آپوپتوز می شود (۶). تجویز EPO در زمان ARF (نارسایی حاد کلیوی) ایسکمیک منجر به مهار آپوپتوز، تشدید دژنراسیون اپیتلیوم توبولی و بهبود عملکرد کلیوی می شود (۷). پاراکسوناز موجود در سرم انسان (آریل دی آلکیل فسفاتاز؛ EC 3.1.8.1) یک استراز وابسته به کلسیم است که ۳۵۴ اسید آمینه دارد (۹،۸). خانواده آنزیم پاراکسوناز (PON) در پستانداران (مثل موش و انسان) سه ژن مجزا دارند. این سه ژن، خیلی نزدیک به یکدیگر روی یک کروموزوم (کروموزوم ۷ در انسان و کروموزوم ۶ در موش) قرار دارند. این سه عضو خانواده پاراکسوناز عبارتند از

می تواند محصولات سمی را که از اکسید شدن اجزای لیپیدی LDL تولید می شوند، غیرفعال کند (۸). PON پروتئینی با وزن مولکولی تقریبی ۴۵ کیلودالتون بوده که در کبد ساخته می شود و در گردش خون به HDL متصل است (۱۰). با توجه به اینکه PON می تواند سوبستراهای مختلفی را هیدرولیز کند دارای چند فعالیت آنزیمی است، از جمله: فعالیت پاراکسونازی (توانایی هیدرولیز پاراکسون) و فعالیت آریل استرازی (توانایی استراهای آروماتیکی مانند فنیل استات) (۱۱). با توجه به اینکه در هر مولکول PON دو یون کلسیم وجود دارد. این یون های کلسیم در مکانیسم کاتالیتیک آنزیم نقش مهمی ایفا می کنند (۱۲). PON به عنوان آنزیمی آنتی اکسیدان است که پراکسیدهای لیپیدی موجود در لیپوپروتئین های اکسید شده را هیدرولیز می کند (۱۳). مشخص شده است که فعالیت پاراکسوناز ارتباط معکوسی با استرس اکسیداتیو در سرم و ماکروفازها دارد (۱۴). کاهش فعالیت پاراکسوناز در گروه های متعدد بیماران نظیر مبتلایان به دیابت، هیپرکلسترولمی و بیماران قلبی-عروقی که دچار افزایش استرس اکسیداتیو هستند، دیده می شود (۱۵). از مجموع مباحث فوق این گونه استنباط می شود که EPO می تواند نقش قابل توجهی را در محافظت از استرس های اکسیداتیو داشته باشد و بنابراین در مطالعه حاضر قصد داریم که تأثیر آن را بر میزان فعالیت آنزیم های PON، سطوح سرمی TAC MDA و نیز غلظت سرمی پروفیل لیپیدی را در رت بسنجیم تا در مرحله بعدی بتوان تأثیر آن را در شرایط بالینی مورد ارزیابی قرار داد.

مواد و روش کار

۳۰ سر موش صحرایی نژاد Wistar از جنس نر بالغ با وزن متوسط ۲۰۰-۲۵۰ گرم بعد از یک هفته نگهداری در اتاق حیوانات و تطبیق با شرایط محیط و سیستم نوری و مراقبت، به صورت تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی A، B، و گروه کنترل (C) دسته بندی شدند. به گروه A، r-EPO 500 IU/Kg (PD poetin، Pooyesh Darou Co. IRAN) به صورت روزانه و داخل صفاقی به مدت هفت روز تزریق شد (۱۶)، به گروه B، r-EPO 100 IU/Kg به موازات گروه A به صورت هفتگی و داخل صفاقی برای مدت چهار هفته و به گروه C در حجم مساوی نرمال سالین به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (۱۷). بعد از اتمام ۷ روز در گروه A و چهار هفته در گروه B از تجویز اریتروپویتین، خون گیری و تهیه سرم از نمونه خون، با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با دستور عملکرد ۳۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

گرفت و مقدار P کم تر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. در بررسی تغییرات از آزمون Paired sample t-test و در مقایسه گروه‌ها از آزمون‌های Independent sample t-test, Mann-Whitney-U, Kruskal-Wallis بهره گرفته شد.

یافته‌ها

در جدول ۱ تغییرات پارامترهای سرمی موردسنجش در سه گروه مورد مطالعه نشان داده شده است و در جدول ۲، P با ارزش حاصل از این تغییرات در سه گروه مورد مقایسه قرار گرفته است. بر طبق نتایج بدست آمده در این جداول در تمام رت های گروه A و B که به ترتیب دوزهای بالا و پایین r-EPO را دریافت کرده بودند، در مقایسه با گروه کنترل (C)، از لحاظ آماری یک افزایش معنی دار ($P < 0.05$) در فعالیت سرمی پاراکسونازی (به ترتیب با $P=0.026$ و $P=0.033$) و فعالیت سرمی آریل استراز (به ترتیب با $P=0.033$ و $P=0.023$) مربوط به PON و افزایش معنی دار دیگری در ظرفیت آنتی اکسیدان تام سرمی (به ترتیب با $P=0.008$ و $P=0.004$) مشاهده شد، همچنین سطح پراکسیداسیون لیپیدی و شاخص مهم آن مالون دی آلدئید در گروه‌های دریافت کننده دوزهای بالا و پایین r-EPO در قیاس با گروه کنترل کاهش معنی داری (به ترتیب با $P=0.002$ و $P=0.020$) را نشان داد. اما در این بررسی مشخص شد، اختلاف معنی داری بر اثر تیمار با دوزهای بالا و پایین و فواصل زمانی مختلف بین تجویز دارو بدست نیامد، بعلاوه تغییرات صورت گرفته بر اثر تزریق این هورمون - دارو در پروفیل لیپیدی شامل کلسترول تام، تری گلیسرید، LDL و HDL از لحاظ آماری بی معنی تشخیص داده شد.

فعالیت پاراکسونازی PON1 با سوبسترای پاراکسون (Sigma) اندازه گیری شد. سرعت هیدرولیز پاراکسون در طول موج ۴۱۲ nm ($\epsilon = 18290 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) با دستگاه UV-اسپکتروفوتومتر (UV 1250, Shimadzu, Japan) سنجیده شد. واحد فعالیت آنزیم به صورت nmol/min/ml serum بیان گردید (۱۸). فعالیت آریل استراز با فنیل استات (Fluka) به عنوان سوبسترا مورد سنجش قرار گرفت (۱۳). سرعت هیدرولیز سوبسترا با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۷۰ nm ($\epsilon = 1310 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) تعیین گردید. نتایج به صورت $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml serum}$ گزارش شد (۱۳). همچنین پروفیل لیپیدی شامل: کلسترول تام، تری گلیسرید و HDL با روش‌های آنزیمی و کیت های شرکت پارس آزمون (تهران) اندازه گیری شدند، ضمناً LDL با فرمول مربوطه (فرد والد) محاسبه گردید (۱۹). ظرفیت آنتی اکسیدان تام در سرم با استفاده از کیت های شرکت راندوکس (Randox Laboratories) Ltd, UK, CatNo.NX2332 اندازه گیری شد. در این روش یک رادیکال کاتیونی تولید می‌شود. محصول به دست آمده، رنگ سبز-آبی نسبتاً پایداری دارد و در طول موج ۵۹۳nm سنجیده می‌شود. آنتی اکسیدان‌های موجود در نمونه میزان رنگ سبز-آبی را کاهش می‌دهند که این کاهش با غلظت آنتی اکسیدان‌های موجود در نمونه متناسب خواهد بود (۲۰). اساس اندازه گیری MDA سرم بر پایه واکنش با تیوباربی‌توریک اسید (TBA)، استخراج با بوتانل نرمال، اندازه گیری جذب با روش اسپکتروفوتومتری و مقایسه جذب با منحنی استاندارد می‌باشد. میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بوتانل نرمال به عنوان بلانک اندازه گیری شد. غلظت MDA هر نمونه از روی منحنی استاندارد تعیین گردید (۲۱). نتایج حاصله با نرم افزار SPSS16 مورد تحلیل آماری قرار

جدول شماره (۱): مقایسه میانگین پارامترهای سرمی بعد از تیمار با r-EPO در سرم موش صحرایی گروه‌های مورد مطالعه

فاکتورهای مورد آزمایش	گروه شاهد n=8 (Mean±S)	گروه دریافت کننده r-EPO دوز پایین n=10 (Mean±SD)	گروه دریافت کننده r-EPO دوز بالا n=10 (Mean±SD)
PON activity (U/ml)	۱۰.۰۶±۱۰.۵۱	۳.۴۳±۱۱۶.۴۹	۴.۶۰±۱۱۷.۷۳
AE activity (U/ml)	۹.۷۳±۷۶.۶۳	۲.۵۴±۸۷.۳۵	۳.۶۷±۸۵.۷۸
MDA ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	۰.۱۴±۱.۷۸	۰.۱۵±۱.۶۰	۰.۱۴±۱.۴۸
TAC ($\mu\text{mol}/\text{l}$)	۰.۱۵±۱.۷۳	۰.۲۴±۲.۱۰	۰.۱۸±۲.۰۳
TC (mg/dl)	۵.۳۹±۸۸.۵۰	۹.۲۱±۸۵.۶۰	۵.۰۳±۸۹.۵۰
TG (mg/dl)	۴.۰۳±۵۱.۰	۳.۱۳±۴۷.۵۰	۴.۱۹±۴۷.۵۰
HDL-C (mg/dl)	۱.۱۱±۲۶.۷۰	۳.۵۵±۲۶.۳۰	۱.۲۹±۲۵.۵۶
LDL-C (mg/dl)	۴.۷۵±۵۱.۶۰	۶.۸۸±۴۹.۸۰	۵.۶۸±۵۴.۴۳

PON activity = فعالیت پاراکسوناز، AE activity = فعالیت آریل استراز، MDA = مالون دی آلدئید، TAC = ظرفیت آنتی اکسیدان تام،

TC = کلسترول تام، TG = تری گلیسرید، HDL = لیپوپروتئین با چگالی بالا، LDL = لیپوپروتئین با چگالی پایین

جدول شماره (۲): مقایسه P با ارزش (P_v) فاکتورهای مورد آزمایش بین گروه‌های مختلف

دوز بالا EPO-r گروه دریافت کننده	دوز پایین EPO-r گروه دریافت کننده	فاکتورهای مورد آزمایش
P ₁ = ۰/۸۲۱	-	PON activity
P ₂ **= ۰/۰۲۶	P ₃ **= ۰/۰۳۳	AE activity
P ₁ = ۰/۲۷۳	-	MDA
P ₂ **= ۰/۰۳۳	P ₃ **= ۰/۰۲۳	TAC
P ₁ = ۰/۱۰۲	-	TC
P ₂ **#= ۰/۰۰۲	P ₃ **#= ۰/۰۲۰	TG
P ₁ = ۰/۴۲۶	-	HDL-C
P ₂ **#= ۰/۰۰۸	P ₃ **#= ۰/۰۰۴	LDL-C
P ₁ = ۰/۴۹۴	-	
P ₂ = ۰/۵۳۳	P ₃ = ۰/۶۸۸	
P ₁ = ۰/۹۰۹	-	
P ₂ = ۰/۰۸۹	P ₃ = ۰/۰۵۴	
P ₁ = ۰/۲۴۱	-	
P ₂ = ۰/۰۶۷	P ₃ = ۰/۶۸۹	
P ₁ = ۰/۰۹۶	-	
P ₂ = ۰/۲۱۴	P ₃ = ۰/۵۳۴	

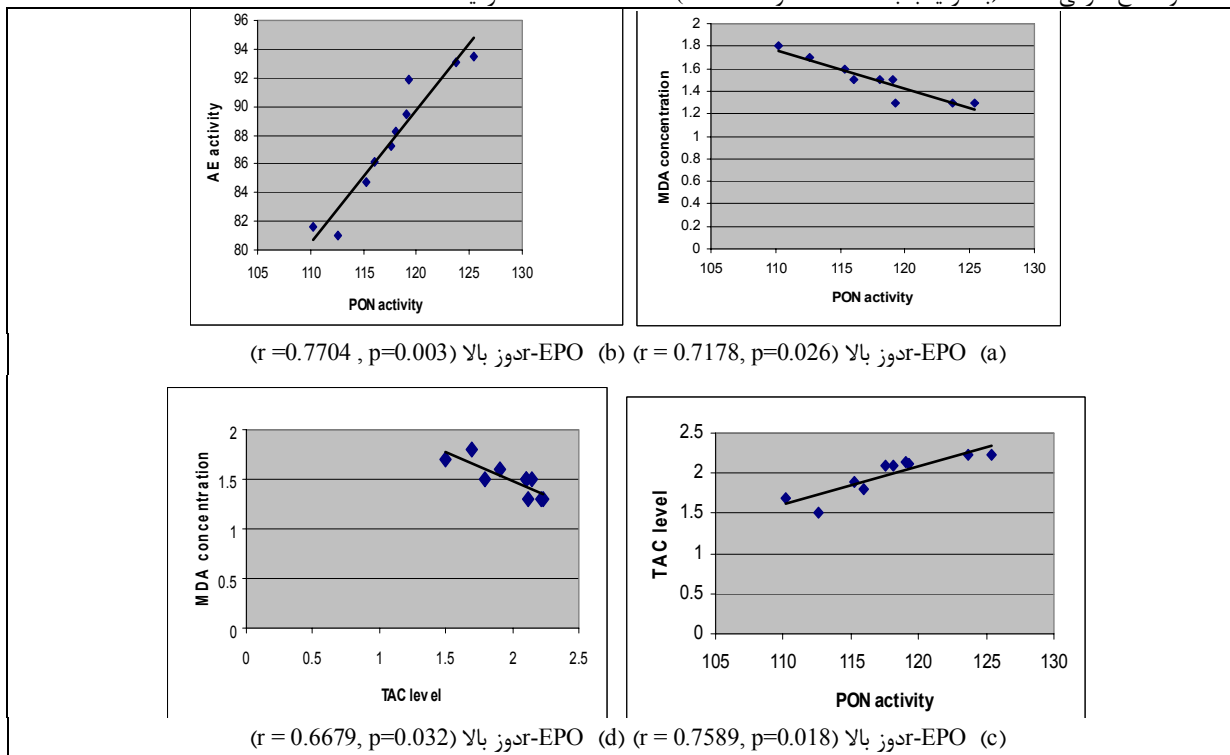
P₁= ارزش P بین گروه دریافت کننده دوز بالای EPO-r و گروه دریافت کننده دوز پایین آن.

P₂= ارزش P بین گروه دریافت کننده دوز بالای EPO-r و گروه کنترل. * (P < ۰/۰۵)

P₃= ارزش P بین گروه دریافت کننده دوز پایین EPO-r و گروه کنترل. ** (P < ۰/۰۱)

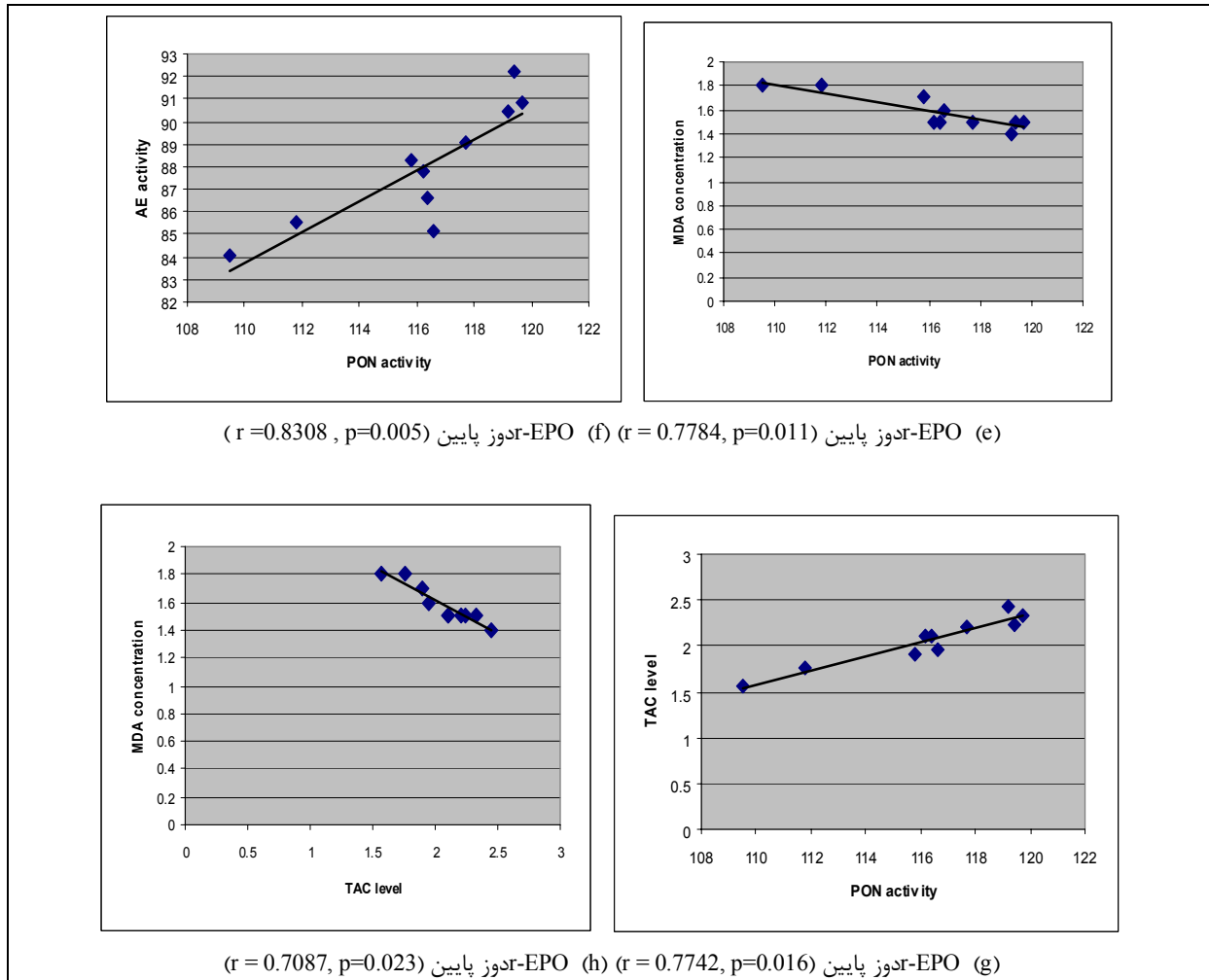
همبستگی مثبت و معنی دار مشاهده شد. علاوه بر مقادیر سرمی MDA-TAC (به ترتیب با r = 0.667 و r = 0.708) و همچنین بین فعالیت آنزیمی PON و غلظت سرمی MDA (به ترتیب با r = 0.717 و r = 0.778) همبستگی معکوس و معنی دار مشاهده گردید.

در اشکال ۱ و ۲ نیز به ترتیب به بررسی همبستگی میان فاکتورهای مورد سنجش در گروه‌های A و B پرداخته‌ایم، بر طبق منحنی‌های ترسیم شده در این اشکال، بین فعالیت آنزیمی PON و AE (به ترتیب با r = 0.770 و r = 0.830) و نیز بین فعالیت PON و سطح سرمی TAC (به ترتیب با r = 0.758 و r = 0.774)



شکل شماره (۱): بررسی همبستگی در گروه موش‌های دریافت کننده EPO-r دوز بالا

همبستگی بین فعالیت *PON* و غلظت *MDA* (نمودار *a*)
 همبستگی بین فعالیت *PON-AE* (نمودار *b*)،
 همبستگی بین فعالیت *PON* و مقدار سرمی *TAC* (نمودار *c*)
 همبستگی بین غلظت *MDA* و مقدار سرمی *TAC* (نمودار *d*)



شکل شماره (۲): بررسی همبستگی در گروه موش‌های دریافت کننده r-EPO دوز پایین

همبستگی بین فعالیت *PON* و غلظت *MDA* (نمودار *e*)
 همبستگی بین فعالیت *PON-AE* (نمودار *f*)
 همبستگی بین فعالیت *PON* و مقدار سرمی *TAC* (نمودار *g*)
 همبستگی بین غلظت *MDA* و مقدار سرمی *TAC* (نمودار *h*)

بحث

می‌گیرد. به علاوه، استرس اکسیداتیو و شاخص مهم آن به فرم *MDA* در این بررسی به هنگام استفاده از r-EPO کاهش نشان می‌دهد، که این موضوع نیز با افزایش فعالیت *PON* و سطح سرمی *TAC* در اثر مصرف r-EPO قابل توجیه است. این بخش از مطالعه می‌تواند از نقش مهم *PON* در جلوگیری از تشکیل *MDA* و آنتی اکسیدان بودن این آنزیم حمایت کند، چرا که همان طور که مشاهده شد به دنبال تیمار با r-EPO مقدار سرمی *TAC* نیز در

مطالعه حاضر که به روش مداخله‌ای تجربی در مرکز تحقیقات کاربردی دارویی تبریز انجام گرفت، پیرامون تأثیر تزریق r-EPO و به دنبال آن بررسی ارتباط فعالیت‌های سرمی پاراکسونازی و آریل استراز *PON* بود و از آن چنین می‌توان نتیجه گرفت که این دو با کاربرد r-EPO افزایش پیدا می‌کنند. همچنین افزایش فعالیت *PON* و میزان *TAC* سرم با کاربرد این دارو متناسب با هم صورت

فاقد ژن PON بودند، مورد آزمایش قرار گرفت. HDL جدا شده از موش‌های فاقد ژن PON قادر نبود تا از اکسیداسیون LDL جلوگیری کند و بالعکس HDL جدا شده از موش‌های کنترل دارای چنین عملکردی بود (۲۸). از جمله محدودیت‌های این مطالعه به تعداد کم نمونه‌های مورد آزمایش و نیز عدم توجه به فنوتیپ‌های آنزیم پاراکسوناز و همچنین به پلی مورفیسم‌های ژنی مختلف آنزیم PON و تأثیر متفاوت r-EPO بر آن‌ها می‌توان اشاره نمود که می‌بایست این موارد را در مطالعات جدیدتر مدنظر قرار داد.

در مطالعه حاضر، برای ارزیابی استرس اکسیداتیو در رت‌های مورد تیمار با اریتروپویتین، ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام و مالون دی‌آلدهید سرم مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌های ما نشان داد که تغییر مقادیر سرمی TAC در گروه‌های دریافت‌کننده r-EPO نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می‌دهد که این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود و این در حالی بود که میزان MDA در گروه‌های مورد تیمار با r-EPO در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار را نشان داد. با توجه به افزایش فعالیت PON در گروه‌های دریافت‌کننده r-EPO نسبت به گروه کنترل، انتظار ما نیز این بود که میزان MDA که شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدی است کاهش یابد. بنابراین، چون افزایش TAC و کاهش MDA در گروه‌های دریافت‌کننده این دارو نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار است، پس می‌توان گفت که تغییرات این دو با تغییرات فعالیت PON در گروه‌های مورد مطالعه هماهنگ است.

در نهایت با توجه به اطلاعات بدست آمده فوق، پیشنهادی مبنی بر تجویز اریتروپویتین در بیماران دچار استرس اکسیداتیو منطقی به نظر می‌رسد، که این امر به دلیل افزایش فعالیت پاراکسوناز سرمی و نقش آنتی‌اکسیدانی آن در کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌تواند قابل تأیید باشد. پیشنهاد دیگر لزوم انجام مطالعات تکمیلی جهت تعمیم تمام اثرات مفید بررسی حاضر از مدل حیوانی به نمونه‌های بالینی در میان بیماران کلیوی، دیابتی، سرطانی و افراد درگیر با مشکلات قلبی-عروقی و هیپرلیپیدمی می‌باشد. چرا که اریتروپویتین به دلیل افزایش عوامل آنتی‌اکسیدان و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در شرایط استرس‌های اکسیداتیو می‌تواند به صورت موثری مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر اثر r-EPO به جهت خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن به ویژه با افزایش فعالیت آنزیم PON در جلوگیری از اثرات مخرب استرس اکسیداتیو که عموماً با اکسیداسیون لیپیدها و

قیاس با گروه کنترل افزایشی معنی‌دار نشان داد. در مطالعه حاضر، هر دو فعالیت پاراکسونازی و آریل استرازی PON در گروه‌های تحت تیمار با r-EPO بررسی شد که دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری بوده و به طور هماهنگ افزایش پیدا کرد. همبستگی مثبت و معنی‌دار دیگری بین فعالیت PON و TAC طبق نتایج حاصل شد. در ادامه یک همبستگی معکوس و معنی‌دار بین فعالیت PON و غلظت سرمی MDA دیده شد. ما بین سطوح سرمی MDA-TAC نیز یک همبستگی معکوس مشاهده کردیم. با توجه به اینکه بیشترین موارد مصرف این دارو در درمان بیماران آمیک، نارسایی مزمن کلیوی و بیماران تحت دیالیز، مبتلایان به HIV که مشکل آئمی دارند و بیماران سرطانی و تحت شیمی‌درمانی درگیر با آئمی گزارش شده است (۳). در مطالعه‌ای که برای بررسی تأثیر همراهی EPO-β و آهن در بیماران با نارسایی کلیه صورت گرفته، بهبودی موثری در کاهش استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی دیده شده است (۲۲) که با نتیجه مطالعات ما هم‌خوانی نشان می‌دهد. مطابق با مطالعات انجام گرفته قبلی معلوم شده است که ژن‌های EPO و PON در محل بازوی بلند کروموزوم ۷ با هم ارتباط ژنتیکی دارند (۲۳). پس احتمالاً تزریق اگزوزن EPO-β باعث مهار بیان EPO آندوژن و به دنبال آن مهار PON می‌شود. چرا که در آن مطالعه با وجود کاهش در غلظت PON علاوه بر آنکه با کاهش فعالیت این آنزیم مواجه نشدند، بلکه تزریق EPO-β به طور شگفت‌انگیزی با افزایش فعالیت PON همراه بود. البته این مشاهده با کاهش استرس اکسیداتیو رخ داده به راحتی قابل توجیه بود، زیرا در بررسی‌های مولکولی معلوم شده که پراکسیدهای لیپیدی طی واکنشی کوالان با گروه -SH آزاد سیستمین در موقعیت ۲۸۴ متعلق به PON منجر به غیرفعال شدن آنزیم پاراکسوناز می‌شود، پس می‌توان گفت کاهش استرس اکسیداتیو باعث افزایش فعالیت پاراکسوناز خواهد شد (۲۴). که موید نتیجه مطالعه حاضر می‌باشد. نکته قابل توجه درباره پروفیل لیپیدی رت‌ها اینک بر خلاف انسان و خرگوش، تری‌گلیسیرید و کلسترول به طور غالب توسط HDL حمل می‌شود نه LDL (۲۵). بنابراین می‌توان گفت تأثیر داروهای کاهش چربی و کلسترول مثل خانواده استاتین‌ها در رت می‌تواند متفاوت از تأثیر آن در انسان یا خرگوش باشد. همچنین در بررسی‌های قبلی مشخص شده که تجمع پراکسیدهای لیپیدی در LDL در حضور PON کاهش می‌یابد (۲۶). مالین و همکارانش نشان دادند که بین فعالیت PON سرمی و پراکسیداسیون لیپیدی ارتباط معکوس وجود دارد (۲۷). که یافته‌های ما نیز موید گزارش مالین بود. در یک مطالعه نقش مستقیم PON در کاهش استرس اکسیداتیو با مطالعه روی موش‌های ترانس ژنیک و موش‌هایی که

همچنین تعمیم نتایج مفید از آزمایشگاه به بالین برای به کارگیری آن با کمترین عوارض جانبی ارزشمند به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

در پایان بر خود فرض می‌دانم، از زحمات اساتید ارجمند و تمامی کارکنان دپارتمان بیوشیمی و آزمایشگاه‌های بالینی دانشکده پزشکی تبریز و همچنین کارکنان محترم مرکز تحقیقات کاربردی دارویی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

MDA به عنوان شاخص مهم پراکسیداسیون لیپیدی مشخص می‌شود، مورد بررسی قرار گرفت. چرا که این اثرات مخرب در طیف وسیعی از بیماران شامل بیماران کلیوی، دیابتی، سرطانی، قلبی-عروقی و هیپرلیپیدمی بسیار مشکل ساز است. علی‌رغم هزینه گران‌قیمت استفاده از دوز بالای r-EPO، تأثیرات آن مشابه دوز پایین r-EPO بود. بنابراین مطالعه حاضر استفاده از دوز بالای r-EPO را پیشنهاد نمی‌کند. البته تحقیقات بیشتر جهت یافتن دوز مصرفی ایده ال دارو، فواصل زمانی مناسب بین دفعات تزریق آن و

References:

- Inoue N, Takeuchi M, Ohashi H, Suzuki T. The production of recombinant human erythropoietin. *Biotechnol Ann Rev* 1995; 1:297-313.
- Li F, Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin on a tightrope: Balancing neuronal and vascular protection between intrinsic and extrinsic pathways. *Neurosignals* 2004; 13: 265-89.
- Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol* 2007; 78(3):183-205.
- Baker JE. Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. *Vascul Pharmacol* 2005; 42: 233-41.
- Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra- hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney Int* 2006; 70: 246-50.
- Lipsic E, Schoemaker RG, van der Meer P, Voors AA, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2161-7.
- Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC. Delayed administration of darbopoetin on erythropoietin protect against ischemic Acute Renal Failure and injury. *Kidney Int* 2006; 69: 1806-13.
- Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 153-63.
- Nguyen SD, Sok D-E. Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilisation. *Biochem J* 2003; 375: 275-85.
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-80.
- Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylayion. *J Biol Chem* 2000; 275: 3957-62.
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshstein B, Khersonsky O. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and antiatherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11: 412-19.
- Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-90.
- Rozenberg O, Rosenblat M, Coleman R, Shih DM, Aviram M. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress: studies in PON1-knockout mice. *Free Rad Biol* 2003; 34: 774-84.
- Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and

- insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86: 193-9.
16. Johnson D, Forman C, Vesey D. Novel renoprotective actions of erythropoietin: New uses for an old hormone. *Nephrology* 2006; 11: 306-12.
 17. Marsillach J, Martínez-Vea A, Marcas L, Mackness B, Mackness M, Ferré N, et al. Administration of exogenous erythropoietin beta affects lipid peroxidation and serum paraoxonase-1 activity and concentration in predialysis patients with chronic renal disease and anaemia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34 :347-9.
 18. Kural BV, Orem C, Uydu HA, Alver A, Orem A.. The effects of lipid lowering therapy on paraoxnase activates and their relationships with the oxidant- antioxidant system in patients with dyslipidemia. *Coron Artery Dis* 2004; 15: 277-83.
 19. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low- density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18: 499-502.
 20. Shimoni N, Kaplan M, Keidar S. Cardiovascular disease in patients with high levels of plasma high density lipoprotein: association with increased plasma oxidative state. *IMAJ* 2003; 5: 702-5.
 21. Bilici M, Efe H, Köroğlu MA, Uydu HA, Bekaroğlu M, Değer O. Anti oxidative enzyme activites and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatment. *J Affect Disord* 2001; 64: 43-51.
 22. Papavasiliou EC, Gouva C, Siamopoulos KC, Tselepis AD. Erythrocyte PAF-acetylhydrolase activity in various stages of chronic kidney disease: effect of long-term therapy with erythropoietin. *Kidney Int* 2005; 68: 246-55.
 23. Ferré N, Marsillach J, Camps J, Mackness B, Mackness M, Riu F, et al. Paraoxonase-1 is associated with oxidative stress, fibrosis and FAS expression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45: 51-9.
 24. Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreassen PA, Sartorio R, Nielsen LS, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 8548-52.
 25. Krause BR., Newton RS. Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride- lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. *Atherosclerosis* 1995; 117: 237-44.
 26. Sanvanich P, Mackness B, Gaskell SJ, Durrington P, Mackness M. The effect of high- density Lipoproteins on the formation of lipid/ protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300:501-6.
 27. Malin R, Laine S, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Jokela H, et al. Lipid peroxidation is increased in paraoxonase L55 homozygotes compared with M- allele carriers. *Free Radic Res* 2001; 34: 477-84.
 28. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, et al. Combined serum paraoxonase knockout/ apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 17527-35.