

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی کلوتو در بیماران همودیالیز و پیوند کلیه

تیمور قاضی زاده^۱، امیر قربانی حق جو^۲، حسن ارگانی^۳، سینا رئیسی^۴، جاوید صفا^۵، جواد علی اصغری^۶، نادره رشتچی زاده^۷

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش ۱۳۹۴/۰۷/۳۰

چکیده

پیش زمینه و هدف: هدف مطالعه حاضر ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی سطوح سرمی کلوتو با بررسی ۸-هیدروکسی ۲-دزوکسی گوانوزین (8-OHdG) به عنوان یک مارکر آسیب اکسیداتیو اسیدهای نوکلئیک در بیماران همودیالیز و پیوند کلیه می باشد.

مواد و روش کار: نمونه های سرمی از ۴۵ بیمار تحت همودیالیز و ۴۵ بیمار پیوند کلیه پایدار جمع آوری گردید. سطوح سرمی کلوتو، iPTH، 8OHdG و ویتامین D (25(OH) D) با استفاده از روش های استاندارد اندازه گیری شد.

یافته ها: سطوح سرمی کلوتو در گروه همودیالیز به نحو معنی داری بالاتر بود ($p \leq 0.001$). اما در سطوح سرمی (8-OHdG) تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نگردید ($p = 0.242$). سطوح سرمی هورمون پاراتیروئید در بیماران همودیالیز به نحو معنی داری بالاتر از گروه پیوند کلیه بود در حالی که همبستگی معنی داری بین سطوح سرمی کلوتو و iPTH در هیچ کدام از دو گروه مورد مطالعه مشاهده نگردید.

بحث و نتیجه گیری: به نظر می رسد که سطوح بالای کلوتو در گروه همودیالیز یک پاسخ ثانویه به غلظت بالای هورمون پاراتیروئید و یا فقط به دلیل مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی در بیماران پیوند کلیه باشد.

کلیدواژه ها: ۸-هیدروکسی ۲-دزوکسی گوانوزین؛ کلوتو؛ همودیالیز؛ پیوند کلیه

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره نهم، ص ۷۵۳-۷۴۳، آذر ۱۳۹۴

آدرس مکاتبه: آذربایجان شرقی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۶۳۲۳۴

Email: ghorbaniamir@hotmail.com

مقدمه

از حالت نرمال بوده و همچنین نشان داده شده است که همودیالیز یا پیوند کلیه خود می تواند باعث افزایش آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در این دسته از بیماران گردد (۴، ۵). گونه های واکنشگر اکسیژن با تهاجم به انواع مختلفی از اجزای سلولی از جمله لیپیدها، پروتئین ها و DNA باعث آسیب سلولی و در نهایت ایجاد استرس اکسیداتیو می شوند. یکی از مارک های دقیق آسیب DNA که در اثر گونه های واکنشگر اکسیژن تولید می شود، 8-OHdG می باشد (۶، ۷). همچنین مطالعات نشان داده است که، افزایش میزان گونه های واکنشگر اکسیژن و پیشرفت استرس اکسیداتیو به طور معکوسی با میزان فیلتراسیون گلومرولی و میزان عملکرد کلیه ارتباط دارد و

بیماری مزمن کلیه به مجموعه نارسایی های عملکردی و ساختاری کلیه اطلاق می شود که بر مبنای میزان فیلتراسیون گلومرولی به پنج مرحله تقسیم می شود و مرحله آخر آن به عنوان بیماری مرحله آخر کلیه شناخته می شود (۱). در این مرحله آسیب عملکردی کلیه تقریباً غیرقابل بازگشت بوده و برای جلوگیری از ایجاد اورمی، بیمار تحت عمل دیالیز یا در نهایت پیوند کلیه قرار می گیرد (۲، ۳). مطالعات انجام شده حاکی از آن است که استرس اکسیداتیو، نقش مهمی در ایجاد آسیب در ارگان های مختلف ایفا می کند و نقش آن در افرادی که دارای نارسایی کلیوی هستند بالاتر

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

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

^۳ استاد نفروالوژی، مرکز تحقیقات کاربردی داروئی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، بخش آزمایشگاه های بالینی، بیمارستان کودکان تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۵ دانشیار نفروالوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۶ نفروالوژیست، گروه اورولوژی، بیمارستان شهید مدرس، مرکز تحقیقات اورولوژی و نفروالوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

^۷ استاد بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

استرس اکسیداتیو باعث تسریع روند آسیب کلیوی می شود که در نهایت موجب کاهش عملکرد کلیه می شود (۸، ۹). مطالعات جدیدتر نشان داده است که باوجود مارکرهای متنوع در بررسی استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی ناشی از آن، 8-OHdG دارای ارزش بالایی می باشد که غلظت آن در سرم بیماران به دنبال آسیب بافتی افزایش می یابد. همچنین برخلاف استرس اکسیداتیو، کلوتو به عنوان یک پروتئین محافظت کننده از کلیه عمل می کند که در خود کلیه به مقدار زیادی تولید می شود. این پروتئین به دو فرم غشایی و ترشحی وجود دارد (۱۰، ۱۱). فرم غشای کلوتو به عنوان کوفاکتور، فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲۳ عمل می کند که باعث توقف ترشح هورمون پاراتیروئید می شود. فرم ترشحی کلوتو دارای عملکردهای متفاوت و متنوعی می باشد (۱۲). کلوتو می تواند آسیب کلیه را کاهش دهد، باعث تسریع روند بهبودی کلیه بعد از ایسکمی شود، سرعت نارسایی کلیه را کاهش دهد و مشکلات بیماران مزمن کلیه را مانند اختلالات مواد معدنی را کمتر کند (۱۳). استرس اکسیداتیو می تواند بیان کلوتو در بافت ها را کاهش دهد (۱۴). در مطالعات قبلی نشان داده است که میزان دفع ادراری کلوتو، در بیماران مرحله آخر کلیه، با میزان عملکرد کلیه مرتبط است. به همین دلیل سطوح کم کلوتو در سرم این بیماران مشاهده شده است (۱۵، ۱۶). هدف مطالعه حاضر ارزیابی خاصیت آنتی اکسیدانی سطوح سرمی کلوتو با بررسی ۸-هیدروکسی ۲-دزوکسی گوانوزین (8-OHdG) به عنوان یک مارکر آسیب اکسیداتیو اسیدهای نوکلئیک در بیماران همودیالیز و پیوند کلیه می باشد.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر در مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شد و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز به شماره ۵/۴/۵۱۲۹ مورد تأیید قرار گرفته است. نمونه های بیماران از تاریخ آذرماه ۱۳۹۲ تا تاریخ اردیبهشت ۱۳۹۳ جمع آوری شد. در این مطالعه ۴۵ بیمار همودیالیز (۲۵ مرد و ۲۰ زن) و ۴۵ بیمار پیوند کلیه (۲۴ مرد و ۲۱ زن) مورد مطالعه قرار گرفتند. رضایت نامه کتبی از همه بیماران گرفته شد. معیارهای خروج از مطالعه شامل موارد زیر بودند: استعمال سیگار، مصرف آنتی اکسیدان، بیماری عفونی، نارسایی قلبی، بدخیمی، بیماری کبدی و کم خونی شدید (هموگلوبین کمتر ۱۰ گرم بر دسی لیتر). همه بیماران پیوند کلیه اریترپوئیتین دریافت کرده اند. معیارهای ورود به مطالعه در بیماران پیوند کلیه مصرف سه داروی سرکوب کننده ایمنی شامل سیکلوسپورین، سل سبت و پردنیزولون می باشد و همچنین نبود شواهدی مبنی بر رد پیوند حداقل در سه ماه گذشته است. همه بیماران همودیالیز و پیوند کلیه مکمل

ویتامین D فعال (۰.۲۵ میلی گرم در روز) دریافت کرده اند. علت ایجاد نارسایی کلیوی شامل نفروپاتی دیابتی، گلوMERONفریت مزمن، بیماری پلی کیستیک کلیه، نفروپاتی فشارخون ایسکمی، نفروپاتی تخریبی و نامشخص می باشد (جدول یک). همه بیماران همودیالیز دارای شرایط ثابت بوده و تحت همودیالیز منظم حداقل طی ۱۴ ماه گذشته بوده اند (سه بار در هفته هر بار ۴ ساعت). همه نمونه ها بعد از یک ناشتای ۱۲ ساعته از وریدهای محیطی بیماران گرفته شد، در بیماران همودیالیز قبل از شروع دیالیز و در بیماران پیوند کلیه قبل از مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی. سرم نمونه های طی ۳۰ دقیقه جدا شد و در دمای ۷۰- تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد. سطوح سرمی کراتینین، آلومین، اوره، کلسترول تام، تری گلیسرید و HDL با روش رنگ سنجی آنزیمی توسط دستگاه اتوآنالیزور (Abbott analyzer, Abbott laboratories, Abbott (Park, North Chicago, IL) و LDL توسط فرمول Friedewald محاسبه گردید. سطوح سرمی فسفر و کلسیم توسط کیت شرکت پارس آزمون اندازه گیری شد. سطوح سرمی کلوتو توسط روش الایزا (Glory Science, USA, Catalog No: 20120821) و توسط دستگاه الایزا ریدر (STATFAX-2100, Multi-detection Multi Plate Reader, USA) اندازه گیری شد. سطوح سرمی 8-OHdG با کیت الایزا (Biospes, China, Catalog No: BYEK1218)، سطوح سرمی 25 OH-D2, D3 با روش الایزا (DIA source, Belgium, Catalog No: KAP1971) و میزان هورمون پاراتیروئید کامل با کیت الایزا (IBL, Germany, Catalog No: NM59041) اندازه گیری شد.

آنالیز آماری توسط نرم افزار SPSS 18 انجام گردید. برای آنالیزهای غیر پارامتریک کمترین-بیشترین مقدار و برای آنالیزهای پارامتریک میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش گردید. تفاوت بین گروه ها توسط آزمون Mann-Whitney U برای داده های غیر پارامتریک و توسط آزمون independent sample t-test برای داده های پارامتریک گزارش گردید. برای تعیین همبستگی بین پارامترهای بیوشیمیایی از Pearson and Spearman coefficient استفاده گردید. در تمامی تست ها $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول یک، خصوصیات کلی ۴۵ بیمار همودیالیز و ۴۵ بیمار پیوند کلیه را نشان می دهد. همان طور که در جدول یک نشان داده شده است هیچ تفاوت معنی داری بین سن و جنس بین دو گروه وجود ندارد. با توجه به پروفایل لیپیدی، غلظت سرمی کلسترول تام، HDL و LDL در گروه همودیالیز بالاتر از گروه پیوند کلیه بود

($p < 0.05$) ولی غلظت سرمی تری گلیسرید در دو گروه تقریباً برابر بود ($p > 0.05$). غلظت سرمی کلسیم در گروه پیوند کلیه بالاتر بود ولی مقدار فسفر در گروه همودیالیز بالاتر بود. همان طور که در جدول نشان داده شده است سطوح سرمی هورمون پاراتیروئید در بیماران همودیالیز به نحو معنی داری بالاتر از گروه پیوند کلیه بود ولی بین سطوح سرمی 8-OHdG در دو گروه تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. مقدار سرمی کلوتو بدون در نظر گرفتن جنس، در گروه همودیالیز بالاتر می باشد. بین زن و مرد در هر دو گروه تفاوت معنی داری بین سطح کلوتو وجود نداشت. همچنین غلظت سرمی ویتامین D غیرفعال در گروه پیوند کلیه بالاتر از گروه همودیالیز بود. همبستگی بین کلوتو و 8-OHdG در گروه همودیالیز و برای مردان این گروه در شکل یک نشان داده شده است. همبستگی معنی داری بین این دو فاکتور در گروه همودیالیز مشاهده گردید. ($r = 0.465$, $p = 0.003$) (شکل یک). در مردان گروه همودیالیز یک همبستگی

مثبت بینانی دو فاکتور مشاهده گردید ($r = 0.521$, $p = 0.002$) (شکل دو) ولی در زنان گروه همودیالیز همبستگی قابل توجهی مشاهده نشد ($r = 0.292$, $p = 0.525$). همچنین در گروه پیوند (هم مردان و هم زنان) هیچ همبستگی معنی داری پیدا نشد. در گروه پیوند کلیه هیچ همبستگی معنی داری بین کلوتو و سن مشاهده نگردید ($r = 0.157$, $p = 0.357$) ولی در گروه همودیالیز یک همبستگی معنی دار و منفی مشاهده شد ($r = -0.319$, $p = 0.037$) (شکل سه). همچنین قابل ذکر است که هیچ همبستگی معنی داری بین کلوتو و iPTH در هیچ کدام از دو گروه مشاهده نشد [همودیالیز ($r = 0.067$, $p = 0.667$)، پیوند کلیه ($r = -0.027$, $p = 0.886$)]. بین کلوتو و ویتامین D هم همبستگی معنی داری در هیچ کدام از دو گروه مشاهده نشد [همودیالیز ($r = 0.271$, $p = 0.087$)، پیوند کلیه ($r = -0.040$, $p = 0.803$)].

جدول (۱): خصوصیات و فاکتورهای بیماران همودیالیز و پیوند کلیه

متغیر	گروه همودیالیز (تعداد=۴۵)	گروه پیوند کلیه (تعداد=۴۵)	p-value
سن (سال)	۵۳ (۳۳-۶۸)	۴۷ (۲۲-۶۲)	۰.۰۶۸
جنسیت (مرد/زن)	۲۰/۲۵	۲۱/۲۴	۰.۸۳۲
تشخیص بیماری، تعداد (/)	-	-	۰.۴۰۳
نفروپاتی دیابتی	۱۵ (/۳۳.۳)	۲۰ (/۴۴.۴)	-
گلو مرونفریت دیابتی	۴ (/۸.۹)	۳ (/۶.۷)	-
بیماری پلی کیستیک کلیه	۶ (/۱۳.۳)	۳ (/۶.۷)	-
نفروپاتی ایسکمی فشار خون	۱۲ (/۲۶.۷)	۱۰ (/۲۲.۲)	-
نفروپاتی تخریبی	۵ (/۱۱.۱)	۹ (/۲۰)	-
علت نامشخص	۲ (/۴.۴)	۰ (/۰)	-
طول مدت دیالیز (ماه)	۲۹.۵۶±۹.۶	۱۹.۵۶±۴.۳ (قبل از پیوند)	□۰.۰۰۱
درمان متداول (/)	-	-	-
کلسیم کربنات	٪۸۲.۲	-	-
ونوفر	٪۷۳.۳	-	-
هپارین	٪۱۰۰	-	-
اریتروپوئیتین	٪۱۰۰	-	-
سیکلوسپورین	-	٪۱۰۰	-
پردنیزولون	-	٪۱۰۰	-
سل سپت	-	٪۱۰۰	-
کلسیم (میلی گرم/دسی لیتر)	۷.۵۴±۱.۳۶	۹.۲۴±۰.۸۷	□۰.۰۰۱

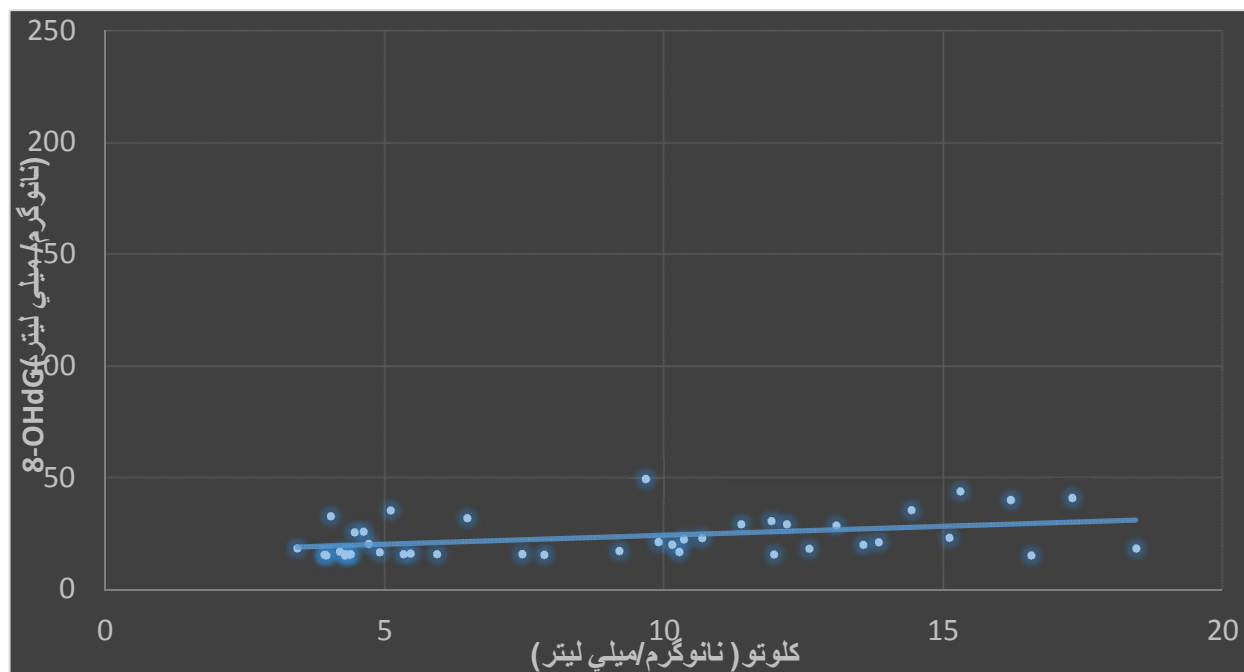
□۰.۰۰۱	۳.۷۷ ± ۰.۶۵	۶.۱۵ ± ۰.۸۳	فسفر (میلی‌گرم/دسی لیتر)
□۰.۰۰۱	۱.۶ (۰.۸-۶.۱۰)	۷.۴۰ (۳.۵۰-۱۰.۴۰)	کراتینین (میلی‌گرم/دسی لیتر)
□۰.۰۰۱	۱۷۲.۵۸ ± ۱۴.۸۱	۱۴۴.۸۷ ± ۸۶.۲۷	کلسترول (میلی‌گرم/دسی لیتر)
۰.۰۲۵	۸۸.۹۹ ± ۲۰.۲۳	۷۸.۲۴ ± ۲۴.۱۷	LDL-C (میلی‌گرم/دسی لیتر)
۰.۰۵۴	۱۸۲.۲۴ ± ۳۶.۲۸	۱۵۸.۳۶ ± ۷۳.۰۳	تری‌گلیسرید (میلی‌گرم/دسی لیتر)
□۰.۰۰۱	۴۷.۱۳ ± ۱۱.۹۰	۳۴.۹۵ ± ۱۱.۴۶	HDL-C (میلی‌گرم/دسی لیتر)
□۰.۰۰۱	۴۲.۰۷ ± ۱۰.۹۲	۱۰۹.۳۳ ± ۲۳.۹۷	اوره (میلی‌گرم/دسی لیتر)
□۰.۰۰۱	۴.۴۲ ± ۰.۴۶	۳.۷۲ ± ۰.۴۷	آلبومین (میلی‌گرم/دسی لیتر)
۰.۰۰۷	۲۱.۱۹ ± ۲.۰۲	۲۲.۳۳ ± ۱.۸۳	ALT (IU/L)
۰.۰۹۵	۱۹.۴۲ ± ۱.۸۱	۱۸.۷۹ ± ۱.۷۲	AST (IU/L)
□۰.۰۰۱	۵.۶۹ ± ۱.۶۵	۹.۱۹ ± ۴.۶۵	کلوتو (نانو گرم/میلی لیتر)
۰.۲۴۲	۱۷.۷۳ (۱۵.۶۵-۶۷.۱۲)	۲۰.۴۶ (۱۵.۵۷-۲۱۴.۰۹)	8-OHdG (نانو گرم/میلی لیتر)
□۰.۰۰۱	۴۱.۹۸ (۱۵.۹۵-۵۱۶.۱۳)	۲۲۳.۳۵ (۳۴.۲۹-۹۶۱.۲۳)	iPTH (نانو گرم/میلی لیتر)
□۰.۰۰۱	۳۵.۵۰ ± ۴.۶۵	۲۹.۵۰ ± ۷.۸۷	25(OH) D (نانو گرم/میلی لیتر)

LDL-C: لیپوپروتئین با چگالی کم، HDL-C: لیپوپروتئین با چگالی بالا، ALT: آلانین آمینوترانسفراز، AST: آسپارات آمینوترانسفراز، 8-OHdG: ۸-هیدروکسی ۲-دزوکسی گوانوزین، iPTH: هورمون پاراتیروئید کامل، 25(OH) D: ۲۵ هیدروکسی کوله کلسیفرول

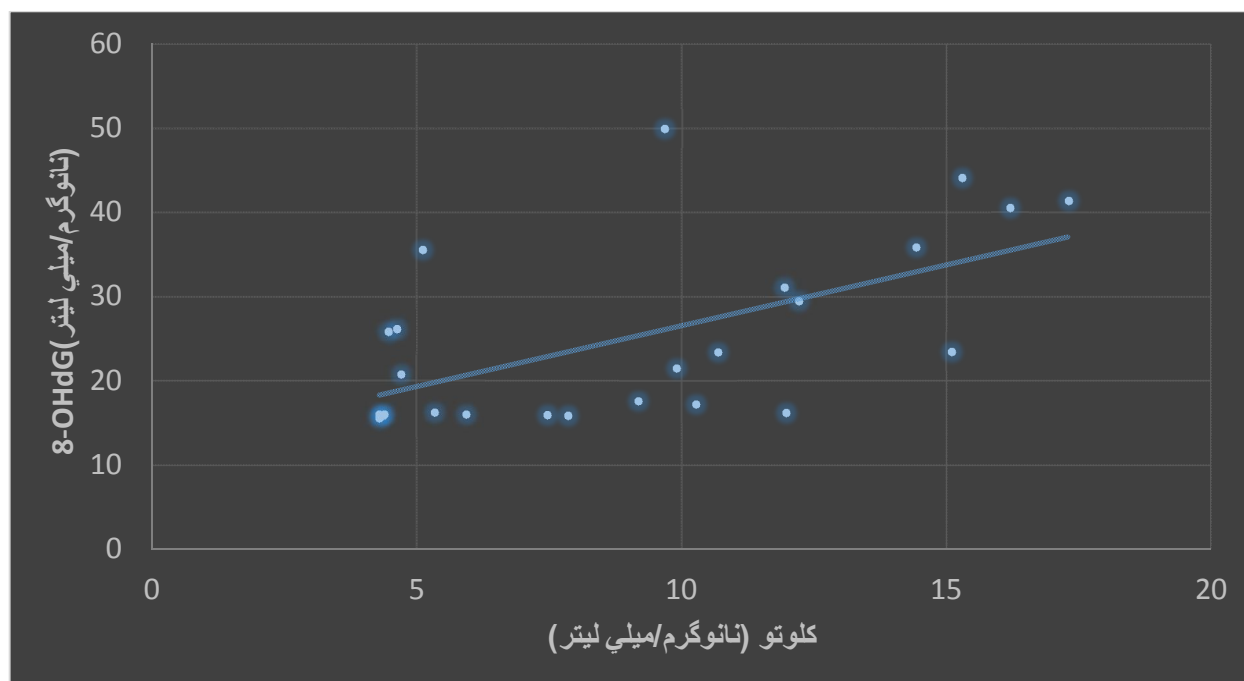
جدول (۱): سطوح کلوتو و 8-OHdG در مردان و زنان

p-value	جنسیت		متغیر
	زن	مرد	
۰.۹۳۳	۹.۲۷ ± ۵.۱۶	۹.۱۴ ± ۴.۳۹	کلوتو (نانوگرم/ میلی لیتر)
۰.۷۲۱	۵.۹۵ ± ۱.۴۱	۵.۷۸ ± ۱.۸۵	همودیالیز کلوتو (نانوگرم/ میلی لیتر)
	۰.۰۱۳	۰.۰۰۲	پیوند کلیه p-value
۰.۴۳۱	۱۸.۷۶ (۱۵.۵۷-۲۱۴.۰۹)	۲۱.۵۷ (۱۵.۶۵-۴۹.۹۷)	8-OHdG (نانو گرم/ میلی لیتر)
۰.۴۵۳	۱۸.۲۳ (۱۵.۸۱-۶۷.۱۳)	۱۶.۸۴ (۱۵.۶۵-۴۴.۰۶)	همودیالیز 8-OHdG (نانو گرم/ میلی لیتر)
	۰.۸۴۳	۰.۱۴۱	پیوند کلیه p-value

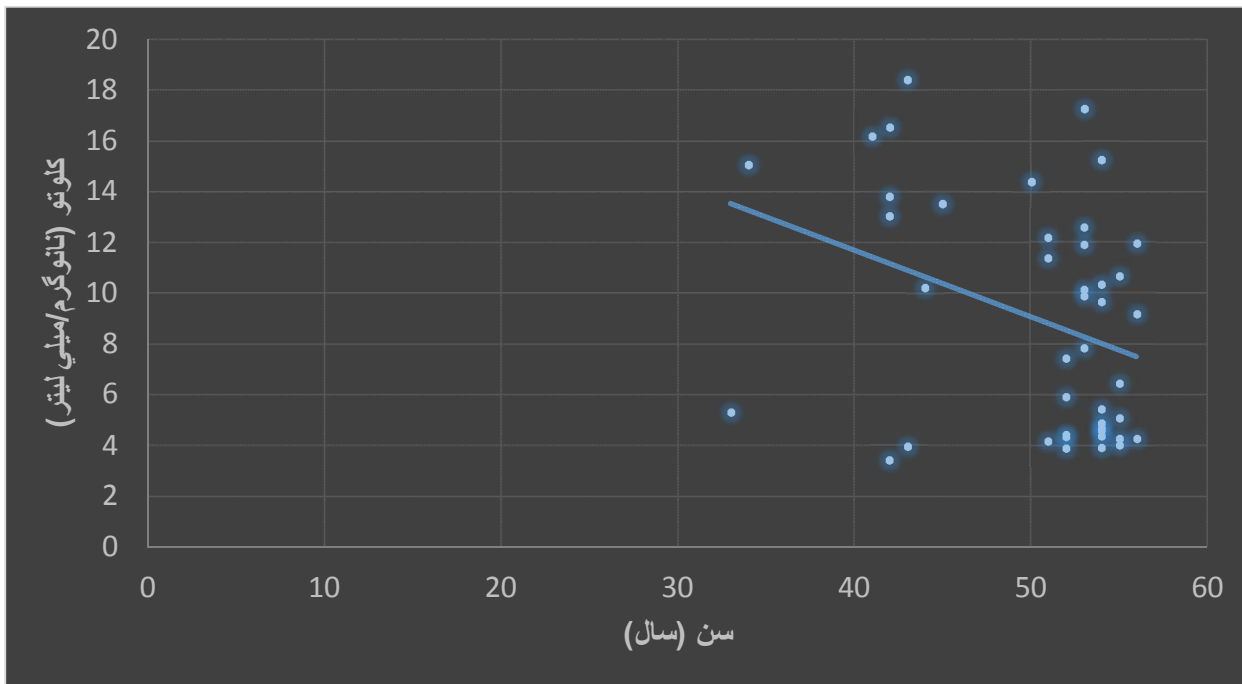
8-OHdG: ۸-هیدروکسی ۲-دزوکسی گوانوزین



شکل (۱): همبستگی کراتین با 8-OHdG ($p:0.003$, $r:0.465$)



شکل (۲): همبستگی کراتین و 8-OHdG در مردان همودیالیز ($p:0.002$, $r:0.521$)



شکل (۳): همبستگی کلوتو و سن در گروه همودیالیز ($p:0.037$, $r: -0.319$)

بحث

آسیب عملکردی اندوتلیال، آترواسکلروز و در نهایت نارسایی قلبی از جمله اختلالات شایع در بیماری مرحله آخر کلیه می باشد که از مقدار بالای آسیب اکسیداتیو ناشی می شود. این سطح بالای آسیب اکسیداتیو یکی از مشخصه های این بیماران می باشد که در اثر از بین رفتن تعادل بین دفاع آنتی اکسیدانی و عوامل ایجادکننده رادیکال های آزاد به وجود می آید (۱۷). دلایل مختلفی برای این حالت وجود دارد از جمله: کاهش غلظت ویتامین C و سلنیم، کاهش غلظت داخل سلولی ویتامین E، افزایش سن، دیابت، اورمی و التهاب مزمن (۱۷). هم چنین کلوتو به عنوان پروتئینی که عمدتاً توسط کلیه تولید می شود دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد (۱۸، ۱۹). Yamamoto و همکارانش در مطالعه ای نشان داده اند که کلوتو می تواند باعث افزایش سطوح سوپراکسید دیسموتاز به عنوان یک آنزیم دارای خاصیت آنتی اکسیدانی شود (۲۰). در مطالعه ای که Mitobe و همکارانش روی سلول های کلیوی انجام دادند معلوم شد که افزایش استرس اکسیداتیو باعث کاهش بیان کلوتو می شود (۲۱). قبلاً معلوم شده است که بعضی از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی مثل سیکلوسپورین باعث آسیب به کلیه می شوند. افزایش تولید گونه ها واکنشگر اکسیژن و تضعیف سیستم آنتی اکسیدانی علل ایجادکننده این آسیب کلیوی می باشند (۲۲-۲۴). با توجه به مطالعات قبلی انجام شده داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی (که توسط بیماران پیوند کلیه مصرف شده است) باعث کاهش سطح

کلوتو می شود (۲۵، ۲۶). Yoon و همکارانش گزارش کرده اند که سیکلوسپورین در موش ها باعث ایجاد نفروپاتی مزمن و کاهش سطح کلوتو می شود (۲۶). در این مطالعه سطوح کلوتو در افراد همودیالیزی بالاتر از گروه پیوند کلیه بود که احتمالاً به دلیل مصرف داروهای سرکوب کننده ایمنی در گروه پیوند کلیه می باشد. افزایش سطح هورمون پاراتیرئید در بیماران کلیوی باعث هیپوکسمی، هیپرفسآسمی و کمبود فرم فعال ویتامین D می شود که این حالت می تواند اصلی ترین علت ایجاد استنودیسτροφی کلیوی در این بیماران می باشد (۲۷). یافته های حاصل از مطالعه ما نشان می دهد که سطوح سرمی هورمون پاراتیرئید در گروه همودیالیز بالاتر از گروه پیوند کلیه می باشد. هر چند این نتایج با نتیجه مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۲ هماهنگی دارد اما عدم بیان و توجیه این اختلاف در گروه های مورد مطالعه از مواردی است که در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد (۲۸). با توجه به نتایج مطالعات اخیر، مشخص شده است که کلوتو با اتصال به FGF23 (فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲۳) می تواند جلوی ساخت و ترشح هورمون پاراتیرئید را بگیرد (۲۹). که در مجموع با این نتایج انتظار می رود در گروهی که سطوح کلوتو بالاتر است میزان هورمون پاراتیرئید کم تر باشد ولی نتایج خلاف این حالت را نشان می دهد. به نظر می رسد علت بیشتر بودن میزان هورمون پاراتیرئید در گروه همودیالیز بیشتر بودن میزان فسفر از حد نرمال (میلی گرم/دسی لیتر ۴.۰-۲.۴) و هم چنین کم تر بودن سطح سرمی کلسیم از حد نرمال (میلی گرم/دسی لیتر ۱۰.۲-۱۰.۰)

۸،۵) در این گروه باشد. البته علاوه بر این مکانیسم می‌توان علت دیگر را هم برای این حالت متصور شد. کلوتو می‌تواند تولید فرم فعال ویتامین D را کاهش دهد (۱۰) و از این طریق می‌تواند مانع از کاهش تولید هورمون پاراتیروئید در اثر افزایش فرم فعال ویتامین D شود. هورمون پاراتیروئید باعث افزایش غلظت شکل فعال ویتامین D از طریق آنزیم هیدروکسیلاز کلیوی می‌شود (۳۰). شرکت فعال ویتامین D یک عامل مثبت در بیان ژن کلوتو می‌باشد و می‌تواند سطح کلوتو را افزایش دهد از این رو هورمون پاراتیروئید می‌تواند از طریق شکل فعال ویتامین D باعث افزایش تولید کلوتو شود (۳۰، ۳۱). شکل غیرفعال ویتامین D برخلاف شکل فعال می‌تواند باعث کاهش سطح کلوتو شود (۳۲). در مطالعه Hryszko و همکارانش مصرف مکمل ویتامین D غیرفعال باعث کاهش سطح کلوتو در بیماران همودیالیز شده است (۳۲). در این مطالعه همانند مطالعه ما هیچ ارتباط معناداری بین سطوح کلوتو با ویتامین D غیرفعال و هورمون پاراتیروئید یافت نشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطح سرمی ویتامین D غیرفعال در افراد پیوند کلیه بالاتر بود. سطح بالاتر هورمون پاراتیروئید و سطح پایین‌تر ویتامین D غیرفعال در بیماران همودیالیز می‌تواند علت بالاتر بودن کلوتو در این گروه بیماران را توجیه کند. بر مبنای مطالعات قبلی یک همبستگی معکوس معنادار بین سطح کلوتو و آسیب اکسیداتیو وجود دارد (۲۵، ۲۶). در گروه پیوند کلیه همبستگی معنی‌داری بین کلوتو و 8-OHdG یافت نشد که احتمالاً به دلیل کاهش سطح کلوتو ناشی از مصرف داروهای سرکوب‌کننده ایمنی در این بیماران می‌باشد. در مردان گروه همودیالیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین کلوتو و 8-OHdG یافت شد در حالی که در زنان همین گروه همبستگی قابل توجهی مشاهده نشد که احتمالاً به دلیل اثر هورمون‌های جنسی زنانه می‌باشد. Barp و همکارانش و هم‌چنین kum-kick و همکارانش گزارش کرده‌اند استروژن‌ها خصوصاً استریول و استرادیول آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که باعث ایجاد اثر آنتی‌اکسیدانی اضافی برای محافظت سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو در زنان می‌شود (۳۳، ۳۴). هم‌چنین Razmara و آنتی‌اکسیدانی هومون‌های استروژنی وجود دارد. در این مکانیسم استروژن‌ها باعث کاهش گونه‌های واکنشگر اکسیژن و استرس اکسیداتیو از طریق فعال سازی آنزیم مگنیز سوپر اکسید دیسموتاز میتوکندریایی می‌شود (۳۵). همبستگی مثبت بین کلوتو و 8-OHdG در مردان گروه همودیالیز احتمالاً یک مکانیسم جبرانی باشد که در آن کلوتو برای مقابله با سطح استرس اکسیداتیو افزایش یافته است. سطح بالای استرس اکسیداتیو باعث کاهش تولید کلوتو در کلیه می‌شود (۲۱) اما شاید در مراحل اولیه یا افزایش کم استرس

اکسیداتیو، مقدار کلوتو به‌طور متناسب با استرس اکسیداتیو افزایش یابد. Nadeem و همکارانش در مطالعه‌ای گزارش کرده‌اند که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیماران مزمن ریوی در مقایسه با افراد سالم غیرسیگاری بیشتر بوده است (۳۶) که می‌تواند دلیلی احتمالی همبستگی مثبت کلوتو و استرس اکسیداتیو در مطالعه ما باشد هم‌چنین همانطور که قبلاً ذکر شد کلوتو از طریق همین آنزیم خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کند. نتایج مطالعه حاضر حاکی آن است که تفاوت معناداری بین سطح کلوتو در مردان و زنان هیچ از دو گروه وجود ندارد. اما در مطالعه Pederson و همکارانش سطح کلوتو به نحو معناداری در زنان بالاتر از مردان بود. برخلاف مطالعه ما که افراد مورد مطالعه از بیماری مرحله آخر کلیه رنج می‌بردند در مطالعه Pederson و همکارانش افراد سالم مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که احتمالاً دلیل اصلی اختلاف بین این دو مطالعه می‌باشد (۳۷).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که با افزایش سن، سطح سرمی کلوتو کاهش می‌یابد (۳۸، ۳۹). Yamazaki و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند که میزان کلوتو در مردان سالم همراه با افزایش سن کاهش می‌یابد (۳۶). هم‌چنین Semba و همکارانش در مطالعه‌ای نشان دادند که غلظت سرمی کلوتو در افراد بزرگسال جوان بیشتر از سالمندان می‌باشد (۳۹). بر طبق مطالعه Hu et و همکارانش احتمالاً دو دلیل برای این روند وجود دارد. اول، تعداد نفرون‌های فعال با افزایش سن کاهش می‌یابد به همین دلیل مقدار تولید و رهاسازی کلوتو به درون خون کاهش می‌یابد. دلیل دیگر، احتمالاً کاهش کلوتو در کلیه بخشی از یک کاهش سیستماتیک در کل بدن باشد که باعث می‌شود کلیه‌ها به آسیب حساس‌تر باشند (۴۰). در بیماران همودیالیزی مطالعه حاضر همبستگی بین سن و کلوتو مطابق با مطالعات قبلی بود ولی در گروه پیوند کلیه همبستگی قابل توجهی یافت نشد که احتمالاً ناشی از مصرف داروهای سرکوب‌کننده ایمنی در گروه پیوند کلیه می‌باشد. به نظر می‌رسد که اثر این داروها بر روی کاهش کلوتو قویتر از اثر سن بر روی کاهش کلوتو باشد.

نتیجه‌گیری

غلظت سرمی کلوتو در بیماران همودیالیز بالاتر از بیماران پیوند کلیه می‌باشد که ممکن ناشی از یک پاسخ ثانویه به غلظت بالای هورمون پاراتیروئید یا غلظت سرمی پایین ویتامین D غیرفعال باشد و یا شاید حتی فقط به دلیل مصرف داروهای سرکوب‌کننده ایمنی در بیماران پیوند کلیه باشد که نیاز به مطالعات با طراحی‌های جدیدتر را طلب می‌نماید.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است که به این وسیله از کلیه مسئولین مرکز مربوطه تشکر و قدردانی می شود.

References:

1. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet* 2012;379(9811):165-80.
2. Eryilmaz M, Ozdemir C, Yurtman F, Cilli A, Karaman T. Quality of sleep and quality of life in renal transplantation patients. *Transplantation proceedings*, Elsevier; 2005. p. 2072-6.
3. Sayin A, Mutluay R, Sindel S. Quality of life in hemodialysis, peritoneal dialysis, and transplantation patients. *Transplantation proceedings*, Elsevier; 2007. p. 3047-53.
4. Odetti P, Giribaldi S, Gurreri G, Aragno I, Dapino D, Pronzato MA, et al. Protein oxidation in hemodialysis and kidney Transplan. *Metabol* 1996;45(11):1319-22.
5. McGrath LT, Treacy R, McClean E, Brown JH. Oxidative stress in cyclosporin and azathioprine treated renal transplant patients. *Clin chimica acta* 1997;264(1):1-12.
6. de Groot H, Littauer A. Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 1989;6(5):541-51.
7. Tarng D-C, Huang T-P, Wei Y-H, Liu T-Y, Chen H-W, Wen Chen T, et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J kidney diseases* 2000;36(5):934-44.
8. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubiña P, Lahera V, Luño J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int* 2008;74:S4-S9.
9. Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *Am J Physiology-Renal Physiol* 2008;294(2):F336-F44.
10. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22(1):124-36.
11. Pavik I, Jaeger P, Ebner L, Wagner CA, Petzold K, Spichtig D, et al. Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplan* 2013;28(2):352-9.
12. Olauson H, Larsson TE. FGF23 and Klotho in chronic kidney disease. *Current opinion in nephrology and hypertension* 2013;22(4):397-404.
13. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. The emerging role of Klotho in clinical nephrology. *Nephrol Dial Transplan* 2012;27(7):2650-7.
14. Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG. The aging kidney. *Kidney Int* 2008;74(6):710-20.
15. Sugiura H, Tsuchiya K, Nitta K. Circulating levels of soluble α -Klotho in patients with chronic kidney disease. *Clin Experimen Nephrol* 2011;15(5):795-6.
16. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Secreted klotho and chronic kidney disease. *Adv Exp Med Biol* 2012;728:126-57.
17. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplan* 2003;18(7):1272-80.
18. Wang Y, Kuro-o M, Sun Z. Klotho gene delivery suppresses Nox2 expression and attenuates oxidative stress in rat aortic smooth muscle cells

- via the cAMP/PKA pathway. *Aging cell* 2012;11(3):410-7.
19. Nagai T, Yamada K, Kim H-C, Kim Y-S, Noda Y, Imura A, et al. Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *FASEB J* 2003;17(1):50-2.
 20. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem* 2005;280(45):38029-34.
 21. Mitobe M, Yoshida T, Sugiura H, Shiota S, Tsuchiya K, Nihei H. Oxidative stress decreases klotho expression in a mouse kidney cell line. *Nephron Exp Nephrol* 2005;101(2):e67-e74.
 22. Ateşşahin A, Çeribaşı AO, Yılmaz S. Lycopene, a Carotenoid, Attenuates Cyclosporine-Induced Renal Dysfunction and Oxidative Stress in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;100(6):372-6.
 23. Galletti P, Di Gennaro CI, Migliardi V, Indaco S, Della Ragione F, Manna C, et al. Diverse effects of natural antioxidants on cyclosporin cytotoxicity in rat renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplan* 2005;20(8):1551-8.
 24. Schmitz V, Klawitter J, Bendrick-Pearl J, Schoening W, Puhl G, Haschke M, et al. Metabolic profiles in urine reflect nephrotoxicity of sirolimus and cyclosporine following rat kidney Transplan. *Nephron Exp Nephrol* 2009;111(4):e80-e91.
 25. Han DH, Piao SG, Song J-H, Ghee JY, Hwang HS, Choi BS, et al. Effect of sirolimus on calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity using renal expression of KLOTHO, an antiaging gene. *Transplan* 2010;90(2):135-41.
 26. Yoon HE, Ghee JY, Piao S, Song J-H, Han DH, Kim S, et al. Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol Dial Transplan* 2011;26(3):800-13.
 27. Ho LT, Sprague SM. Renal osteodystrophy in chronic renal failure. *Seminars in nephrology*; 2002: New York, NY: Grune & Stratton; 2002. p. 488-93.
 28. Argani H, Ghorbanihaghjo A, Panahi G, Rashtchizadeh N, Safa J, Meimand SM. Serum Fetuin-A and Pentraxin3 in hemodialysis and renal transplant patients. *Clin Biochemis* 2012;45(10):775-9.
 29. Olauson H, Lindberg K, Amin R, Sato T, Jia T, Goetz R, et al. Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion. *PLoS genetics* 2013;9(12):e1003975.
 30. Torres P-U, Prie D, Molina-Bletry V, Beck L, Silve C, Friedlander G. Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int* 2007;71(8):730-7.
 31. Forster RE, Jurutka PW, Hsieh J-C, Haussler CA, Lowmiller CL, Kaneko I, et al. Vitamin D receptor controls expression of the anti-aging klotho gene in mouse and human renal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;414(3):557-62.
 32. Hryszko T, Rydzewska-Rosolowska A, Gozdzikiewicz J, Brzosko S, Koc-Zorawska E, Zelazowska-Rutkowska B, et al. Cholecalciferol supplementation reduces soluble Klotho concentration in hemodialysis patients. *Pol Arch Med Wewn* 2013;123:277-81.
 33. Kume-Kick J, Ferris DC, Russo-Menna I, Rice ME. Enhanced oxidative stress in female rat brain after gonadectomy. *Brain Res* 1996;738(1):8-14.
 34. Barp J, Araújo ASdR, Fernandes TRG, Rigatto KV, Llesuy S, Belló-Klein A, et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. *Brazilian J Med Biol Res* 2002;35(9):1075-81.
 35. Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V. Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative

- stress in female and male rats. *Brain Res* 2007;1176:71-81.
36. Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111(1):72-8.
 37. Pedersen L, Pedersen SM, Brasen CL, Rasmussen LM. Soluble serum Klotho levels in healthy subjects. Comparison of two different immunoassays. *Clin Biochemis* 2013;46(12):1079-83.
 38. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *J Am Geriatrics Soc* 2011;59(9):1596-601.
 39. Yamazaki Y, Imura A, Urakawa I, Shimada T, Murakami J, Aono Y, et al. Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;398(3):513-8.
- Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and Chronic Kidney Disease. *Contrib Nephrol* 2013;180:47-63.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF KLOTHO IN HEMODIALYSIS PATIENTS AND RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

Teimour Ghazizadeh¹, Amir Ghorbani Haghjo^{2*}, Hassan Argani³, Sina Raeisi⁴, Javid Safa⁵, Javad Aliasgari⁶, Nadereh Rashtchizadeh⁷

Received: 16 Aug, 2015; Accepted: 22 Oct, 2015

Abstract

Background & Aims: The aim of this study was to evaluate serum levels of antioxidant property Klotho by examining 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine (8-OHdG), as a marker of oxidative damage in nucleic acids in patients with hemodialysis and kidney transplantation.

Materials & Methods: Serum samples from 45 patients undergoing hemodialysis and 45 patients with stable renal transplant recipients were collected. Klotho levels, 8OHdG, iPTH and vitamin D (25 (OH) D) were measured using standard methods.

Results: Klotho level in hemodialysis patients was significantly higher ($p \leq 0.001$). Considering the serum levels (8-OHdG), there was no significant difference between the two groups ($p = 0.242$). Serum parathyroid hormone levels in hemodialysis patients was significantly higher while the correlation between serum levels of iPTH and Klotho in none of the two groups were observed.

Conclusion: It seems that high levels of Klotho in hemodialysis patients is a secondary response to high levels of parathyroid hormone, or just due to the use of immunosuppressive drugs in renal transplant recipients.

Keywords: 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine, Klotho, Hemodialysis patients, Renal transplant recipients

Address: Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel: +98 4133363234

Email: ghorbaniamir@hotmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2015; 26(9): 753 ISSN: 1027-3727

¹ MSc Student in Clinical Biochemistry, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

² Professor in Clinical Biochemistry, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Professor in Nephrology, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Resident in Clinical Biochemistry, Division of Clinical Laboratory, Children's Hospital, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵ Associate Professor in Nephrology, Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁶ Nephrologists, Department of Urology, Shahid Modarres Hospital, Urology and Nephrology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁷ Professor in Clinical Biochemistry, Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran