

# اثر اسید آسکوربیک و تجویز توام آن با L-NIL در جلوگیری از کاهش ویتامین E ناشی از LPS در کلیه موش صحرائی

لیلا پیرمادی (کارشناس ارشد)\*، دکتر مهری کدخدایی (دانشیار)\*، دکتر صدیقه شمس (استادیار)\*\*، دکتر اصغر قاسمی (کارشناس)\*، دکتر نسرین مکی\*\*

\* گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\* گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

## چکیده

**مقدمه:** امروزه بسیاری از بیماری‌ها را به نوعی با استرس اکسیداتیو مرتبط می‌دانند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن به عنوان عوامل ایجاد استرس اکسیداتیو مطرح می‌باشند. لیپولی‌ساکارید با دومکانیسم تولید مقادیر فراوان نیتریک اکساید (NO) به دنبال القای (iNOS (inducible Nitric oxide synthase) و ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (OFR) موجب شوک سپتیک می‌شود. این سندرم معمولاً با نارسایی ارگان‌های حیاتی از جمله کلیه همراه است. ویتامین E مهمترین آنتی‌اکسیدان محلول در چربی است که نقش مهمی در حفاظت غشاءهای بیولوژیک در برابر استرس اکسیداتیو دارد. ویتامین C نیز مهمترین آنتی‌اکسیدان محلول در آب و رفته‌گر رادیکال‌های آزاد بوده که به علت خاصیت رژنراسیون و احیای مجدد ویتامین E اکسید شده در حفاظت سلول‌ها حائز اهمیت است. در این مطالعه میزان تغییرات ویتامین E پلاسما و کلیه موش صحرائی بدنبال تزریق لیپولی‌ساکارید و نیز اثر مهار تولید نیتریک اکساید توسط [L-NIL N(6)-(1-iminoethyl)lysine] (مهارکننده اختصاصی iNOS) و برداشت رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط ویتامین C و اثر توأم این دو بر این تغییر سنجیده شد.

**مواد و روشها:** بدین منظور موش‌های صحرائی نر از نژاد Sprague-Dawley را به ۵ گروه تقسیم کردیم: دریافت نرمال سالین (کنترل)، دریافت LPS (Lipopolysaccharide)، دریافت LPS همراه با L-NIL، دریافت LPS پس از گاوآژ ویتامین C و دریافت LPS و L-NIL پس از گاوآژ ویتامین C. متغیرهای مورد مطالعه شامل BUN, Creatinine, LDH سرم، ویتامین E پلاسما و کلیه بود که ویتامین E با دستگاه HPLC اندازه گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصله نشان داد که LPS سبب کاهش غلظت ویتامین E پلاسما و کلیه ( $p < 0.001$ ) شده و غلظت BUN و LDH را ( $p < 0.001$ ) افزایش می‌دهد. L-NIL و ویتامین C و ترکیب توأم آنها موجب بازگشت پارامترهای فوق به حد نرمال شدند. تجویز توأم ویتامین C و L-NIL موجب افزایش قابل توجه ویتامین E کلیه و پلاسما نسبت به گروه کنترل شد ( $p < 0.001$ ).

**نتیجه گیری و توصیه ها:** این نتایج موید این مطلب است که مهار تولید نیتریک اکساید و برداشت رادیکال‌های آزاد می‌تواند از کاهش ویتامین E پلاسما و کلیه در شوک سپتیک جلوگیری نموده و عملکرد کلیه را بهبود بخشد.

## مقدمه

شوک سپتیک یک عارضه تهدید کننده حیات به صورت عفونت سیستمیک سراسری در بدن است که به دنبال گشادی پاتوفیزیولوژیک عروق، اختلالات هماتولوژیکی و عملکردی و نارسایی ارگان‌ها، میانجی‌های التهابی توسط سیستم ایمنی آزاد می‌شود. شوک سپتیک سالانه ۳۰۰ تا ۵۰۰ هزار بیمار را در ایالات متحده مبتلا می‌کند که علیرغم مراقبت‌های ویژه پیشرفته، آنتی‌بیوتیک‌های جدید و تحقیق‌های وسیع در پاتوفیزیولوژی این سندرم، مرگ و میر آن حدود ۲۰ تا ۵۵٪ است. و اگر این عارضه با نارسایی چندین ارگان همراه باشد مرگ و میر تا ۷۰٪ افزایش می‌یابد. علامت کلیدی شوک سپتیک افت شدید فشار خون است که اغلب با نارسایی چند ارگان مهم بدن از قبیل ریه، کلیه، کبد و مغز همراه است (۱). یکی از علل عمده ایجاد شوک سپتیک لیپوپلی‌ساکارید (LPS)، بخش گلیکولیپیدی غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی است (۲،۳،۴) که موجب تولید سایتوکاین‌ها و واژودیلاتورهای از قبیل نیتریک اکساید می‌شود. تولید مقادیر زیاد نیتریک اکساید بدنال القای iNOS وابسته به سایتوکاین اتفاق می‌افتد که در پیشرفت شوک سپتیک نقش دارد (۵،۶،۷،۲). عارضه جدی ایجاد شده در شوک سپتیک نارسایی حاد کلیه می‌باشد که در مرگ و میر بالای اندوتوکسمی بطور قابل توجهی نقش دارد (۸). زیرا LPS از طریق افزایش فعالیت iNOS inducible (Nitric oxide synthase) موجب تولید نیتریک اکساید در کلیه شده (۲) و همچنین موجب افزایش ROS (۹) و تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن نظیر سوپراکساید و رادیکال‌های هیدروکسیل در کلیه می‌شود (۲). بدین ترتیب LPS با ایجاد محیط استرس اکسیداتیو موجب آسیب کلیوی می‌گردد (۲). در مقابله با استرس اکسیداتیو موادی بنام آنتی‌اکسیدانها وجود دارند که نقش مهمی در دفاع از سیستم‌های بدن بازی می‌کنند. ویتامین

C، ویتامین E، بتاکاروتن اغلب به عنوان ویتامین‌های آنتی‌اکسیدان نامیده می‌شوند که آسیب اکسیداتیو در انسان را محدود می‌کنند (۱۰). یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم محلول در چربی در بدن ویتامین E می‌باشد که نقش مهمی در حفاظت غشاءهای بیولوژیک در برابر استرس اکسیداتیو دارد (۱۱). ویتامین C نیز یک آنتی‌اکسیدان محلول در آب است که موجب حفظ سلول و اجزاء سلولی در مقابل رادیکال‌های آزاد و آسیب اکسیدان‌ها می‌شود (۱۲). ویتامین C روی ویتامین E اثر سینرژیک داشته و موجب رژنراسیون توکوفرول اکسیده می‌شود (۱۲). همچنین ویتامین C در خارج سلول‌ها همراه با ویتامین E موجود در غشاءهای سلولی عمل کرده و با تخریب رادیکال‌های آزاد از پراکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری می‌کند (۱۲). از طرف دیگر پیشنهاد شده است که مهارکننده‌های اختصاصی iNOS از اثرات سلولی مضر نیتریک اکساید در طول شوک سپتیک جلوگیری می‌کنند (۱۳).

### L-NIL یا L-N(6)-(1-iminoethyl)lysine

یکی از مهارکننده‌های اختصاصی iNOS است که موجب کاهش غلظت نیتریک اکسید تولید شده از طریق این آنزیم می‌شود (۱۳). همچنین از کاهش GFR و کاهش غلظت cNOS (۱۴،۱۵) جلوگیری کرده و بدین ترتیب موجب کاهش سمیت کلیوی ناشی از LPS می‌شود (۲). با توجه به اینکه متعاقب سپتی‌سمی هم تولید نیتریک اکساید در کلیه افزایش یافته و هم رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید می‌شود که می‌تواند بر عملکرد و وضعیت آنتی‌اکسیدانی کلیوی اثر داشته باشد و نیز نظر به ارزش ویتامین C در مهار OFR و نقش L-NIL در مهار تولید نیتریک اکساید در این تحقیق بر آن شدیم تا با تزریق LPS در موش صحرائی ایجاد شوک سپتیک نموده سپس با مصرف ویتامین C و L-NIL و نیز تجویز توأم آنها هر چه بیشتر به نقش واقعی OFR و NO ناشی از القای iNOS در ایجاد نارسایی کلیوی در این مدل پی ببریم.

## مواد و روش‌ها

نمونه خون از ورید کلیوی جهت تهیه پلاسما و با سرنگ دیگر یک نمونه خون از ورید اجوف تحتانی جهت تهیه سرم گرفته شد. پس از جداسازی کلیه راست از ناف، آن را داخل محلول PBS شستشو داده، کپسول آن را جدا نموده، در فویل آلومینیم پیچیدیم و سپس در فریزر  $-72^{\circ}\text{C}$  به صورت منجمد نگهداری کردیم. نمونه خون جهت تهیه سرم به مدت ربع ساعت در محیط آزمایشگاه نگهداشته شد تا لخته گردد و سپس با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سرم از آن جدا شد. نمونه خون جهت پلاسما در سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ شد.

استخراج و سنجش ویتامین E در پلاسما و کلیه

استخراج ویتامین E از پلاسما

برای استخراج ویتامین E پلاسما از روش Arnaud (۲۰) استفاده شد. که پس از انجام مراحل مختلف استخراج نمونه آماده سنجش ویتامین E توسط دستگاه HPLC است. برای استخراج استاندارد خارجی نیز مراحل فوق انجام می‌شود. فقط بجای ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما از ۲۰۰ میکرولیتر استاندارد خارجی با غلظت‌های معین ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومول در لیتر استفاده می‌کنیم.

استخراج ویتامین E از کلیه

برای استخراج ویتامین E در کلیه از روش peng (۲۱، ۲۲) استفاده شد. که پس از انجام مراحل مختلف استخراج نمونه آماده سنجش ویتامین E توسط دستگاه HPLC است.

طرز تهیه استاندارد خارجی

وزن مولکولی آلفا - توکوفرول  $430/72$  گرم است. به میزان  $107/68$  میلی‌گرم از آلفا توکوفرول را در  $50\text{ cc}$  اتانول حل کردیم که محلول ۵ میلی‌مولار بدست آمد سپس با رقیق کردن، محلول‌های ۱/۲۵ الی ۱۰ بدست آوریم.

۴۰ عدد موش صحرایی نر از نژاد Sprague-

Dawley در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم جمعیت مورد مطالعه این تحقیق بود. نمونه‌گیری از نوع تصادفی ساده بوده که نمونه‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند و تعداد نمونه در هر گروه ۸ عدد بود. سنجش غلظت اوره، کراتینین، لاکتات دهیدروژناز با دستگاه اتوالیزر هیتاچی و به روش اسپکتروفتومتری انجام شد. سنجش غلظت ویتامین E پلاسما و کلیه با دستگاه HPLC با ردیاب UV صورت گرفت. پس از تهیه موش‌های صحرایی، آنها را به مدت دو هفته در شرایط غذایی و محیطی یکسان قرار دادیم تا سازگاری یابند. سپس آنها به پنج گروه هشت تایی تقسیم کردیم.

۱- گروه کنترل که جهت ایجاد استرس تزریق، نرمال سالین را به صورت IV دریافت کردند.

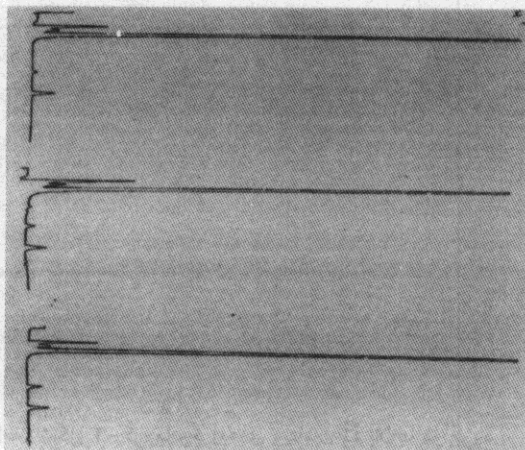
۲- گروه LPS که LPS با دوز  $3\text{ mg/kg}$  به صورت IV (۱۶، ۱۹، ۱۸، ۹، ۱۷، ۲، ۶، ۱۳، ۳) تزریق گردید.

۳- گروه L-NIL + LPS که LPS را با همان دوز گروه دوم دریافت کرده و L-NIL را با دوز  $3\text{ mg/kg}$  به صورت iP، ۲ دقیقه بعد و سه ساعت پس از تزریق LPS دریافت کردند.

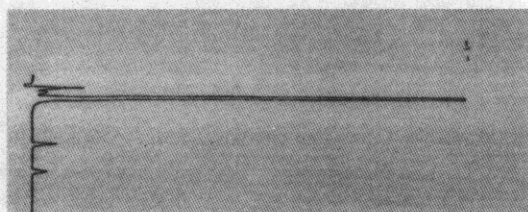
۴- گروه Vitamin C + LPS که رت‌ها مقدار ۷۰۰ میلی‌گرم ویتامین C را به مدت ۵ روز متوالی به صورت گاوژ دریافت کرده و در روز ششم تحت تزریق LPS مانند گروه دوم قرار گرفتند.

۵- گروه L-NIL + Vitamin C + LPS که روش و دوز هر کدام مطابق گروه‌های ۲، ۳ و ۴ به صورت ترکیب انجام شد.

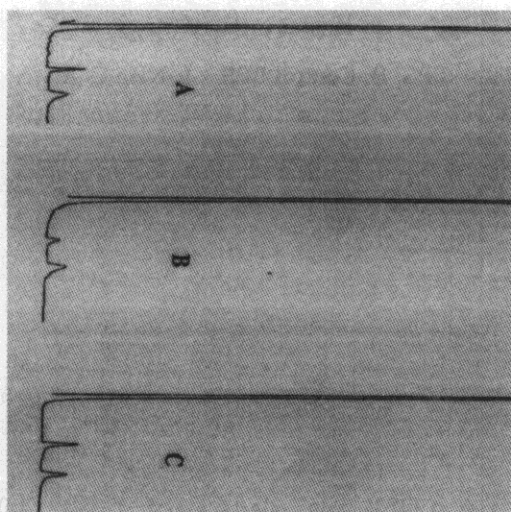
طول دوره آزمایش برای تمامی گروه‌ها ۸ ساعت بود. در پایان دوره آزمایش حیوان با تزریق  $50\text{ mg/kg}$  کتامین به صورت ip بیهوش گردید. سپس با ایجاد برشی در شکم حیوان، روده‌ها را کنار زده و کلیه‌ها را نمایان ساختیم. آنگاه با یک سرنگ آغشته به EDTA یک



شکل ۱- کروماتوگرام های استاندارد ویتامین E در غلظت های ۱/۲۵، ۲/۵، ۵ میکرو مول در لیتر



شکل ۱- (ادامه) کروماتوگرام استاندارد ویتامین E در غلظت های ۱۰ میکرو مول در لیتر



شکل ۲- کروماتوگرام های ویتامین E پلازما در گروه A: LPS: B, Control LPS + L-NIL: C

### طرز تهیه استاندارد داخلی

وزن مولکولی  $\alpha$  - توکوفرول استات به عنوان استاندارد داخلی ۴۷۲/۷۶ گرم بود که ۱۸/۱۷ میلی گرم از آنرا در ۵۰ CC اتانول خالص حل کردیم تا محلول ۵ میلی مولار بدست آمد.

### نحوه اندازه گیری ویتامین E با دستگاه HPLC

کروماتوگرافی مورد استفاده در این مطالعه از نوع فاز معکوس بوده و فاز متحرک در این سیستم متانول خالص بود. ابتدا فاز متحرک را فیلتره نموده و در مخزن حلال دستگاه HPLC می ریزیم. سپس با استفاده از گاز هلیم آنرا عاری از گاز می نماییم. آنگاه بتدریج جریان فاز متحرک را افزایش داده تا فشار در سیستم افزایش یابد. سپس در طول موج دکتور UV ۱۹۲ نانومتر نمونه ها به دستگاه تزریق شد.

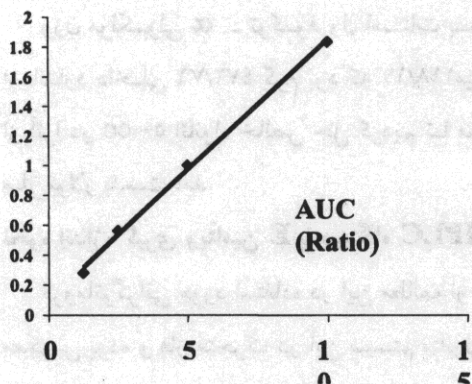
### روش تجزیه و تحلیل داده ها

جهت مقایسه میانگین بین گروهها از آنالیز واریانس یکطرفه استفاده شد و برای تعیین گروهی که تفاوت معنی داری با گروههای دیگر داشت از پس آزمون LSD استفاده گردید.

### یافته ها

شکل ۱ کروماتوگرام های استاندارد های خارجی ویتامین E، شکل ۲ کروماتوگرام های ویتامین E پلازما و شکل ۳ کروماتوگرام های ویتامین E کلیه را در گروه های مختلف نشان می دهد. استانداردهای خارجی در ۴ غلظت معین تهیه می شدند که عبارت است از غلظت ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ میکرومولار از ویتامین E که منحنی خطی غلظت به دست آمده آن در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است که از روی این منحنی غلظت ویتامین E در نمونه های مورد آزمایش محاسبه گردیدند.





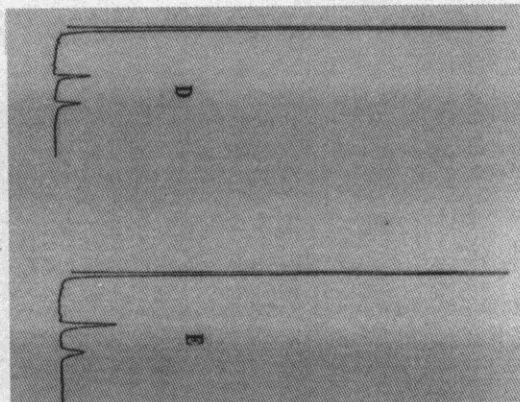
نمودار ۱- منحنی استاندارد ویتامین E

تغییرات غلظت ویتامین E پلاسما

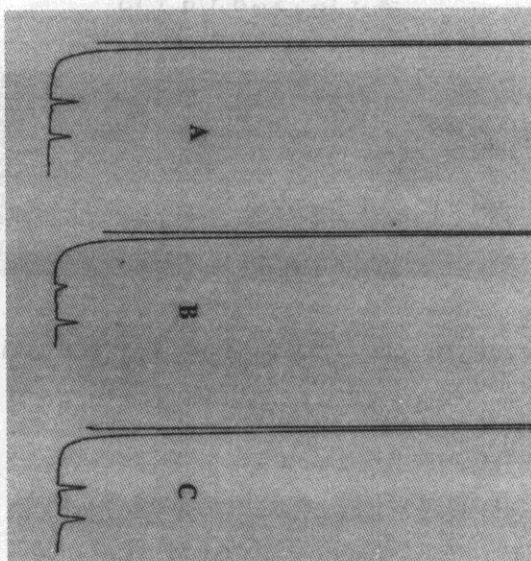
نمودار ۲ میانگین و خطای معیار غلظت ویتامین E در پلاسما را در گروه‌های کنترل، L-NIL + LPS، LPS، LPS + ویتامین C و L-NIL + LPS + ویتامین C نشان می‌دهد. میانگین غلظت ویتامین E در پلاسما برحسب میکرومول در لیتر در گروه کنترل  $12/11 \pm 0/23$ ، در گروه LPS  $8/21 \pm 0/19$ ، در گروه L-NIL+LPS  $11/50 \pm 0/18$ ، ویتامین C  $11/55 \pm 0/23$  و در گروه LPS + ویتامین C  $15/40 \pm 0/23$  L-NIL+ ویتامین E با گروه LPS ( $p < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد. مقدار ویتامین E گروه L-NIL+LPS و گروه Vitamin C + LPS تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت. مقدار ویتامین E گروه LPS + L-NIL + vitamin C با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0.001$ ).

تغییرات غلظت ویتامین E بافت کلیه

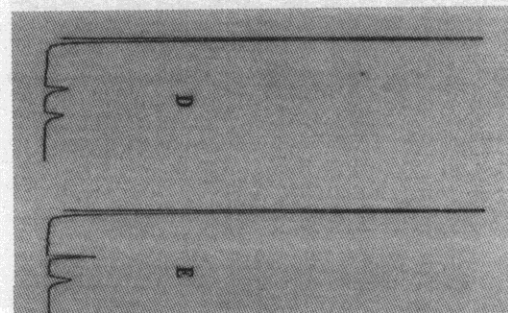
نمودار شماره ۳ مقایسه میانگین و خطای معیار غلظت ویتامین E در بافت کلیه را در گروه‌های کنترل، LPS، LPS + ویتامین C، LPS + L-NIL و LPS + ویتامین C + L-NIL نشان می‌دهد. میانگین



شکل ۲- کروماتوگرام‌های ویتامین E پلاسما در گروه LPS + L-NIL + Vitamin C: E, LPS + Vitamin C :D



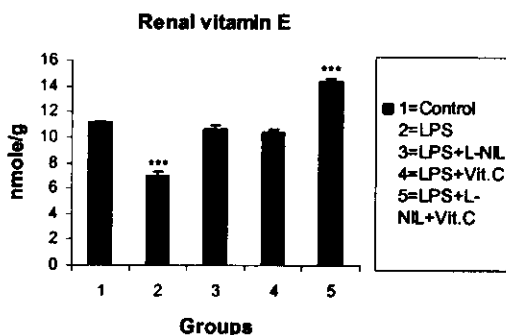
شکل ۳- کروماتوگرام‌های ویتامین E کلیه در گروه LPS: B, Control LPS + L-NIL: C :A



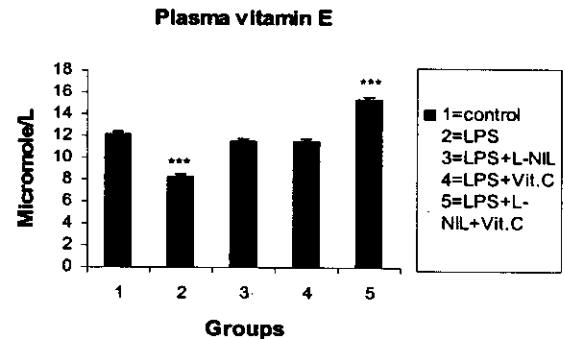
شکل ۳- (ادامه) کروماتوگرام‌های ویتامین E کلیه در گروه LPS+L-NIL+Vitamin C: E, LPS+Vitamin C: D Concentration (μm/L)

۲۰ میلی گرم در دسی لیتر، در گروه LPS  $27/40 \pm 2/42$ ، در گروه LPS + L-NIL  $24/25 \pm 1/03$ ، و در گروه LPS + ویتامین C  $25/00 \pm 1/15$ ، در گروه LPS + ویتامین C  $23/95 \pm 0/73$  میلی گرم در دسی لیتر است. در این نمودار گروه LPS با گروه کنترل تفاوت معنی داری را با  $p < 0.001$  نشان می دهد. گروه های L-NIL + LPS، LPS + ویتامین C و L-NIL + LPS با گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان نمی دهند.

نمودار شماره ۵ میانگین و خطای معیار LDH را در گروه های کنترل، LPS، LPS + L-NIL، ویتامین C و L-NIL + LPS + ویتامین C می دهد. در گروه کنترل میانگین غلظت LDH سرم  $12/35 \pm 12/12$  U/L، در گروه LPS  $10/13 \pm 0/57$ ، در گروه LPS + ویتامین C  $291 \pm 31/74$  و در گروه LPS + ویتامین C + L-NIL  $17/74 \pm 17/33$  U/L می باشد در این نمودار مقدار LDH گروه LPS با گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان می دهد. در گروه های LPS + ویتامین C، LPS + L-NIL و LPS + ویتامین C با گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت.



نمودار ۳- مقایسه میانگین و خطای معیار غلظت ویتامین E کلیه در گروه های کنترل، LPS، LPS + L-NIL، LPS + ویتامین C و LPS + ویتامین C + L-NIL + ویتامین C بر حسب نانو مول در گرم بافت



نمودار ۲- مقایسه میانگین و خطای معیار غلظت ویتامین E پلاسما در گروه های کنترل، LPS، LPS + L-NIL، LPS + ویتامین C و LPS + ویتامین C + L-NIL + ویتامین C بر حسب میکرومول در لیتر

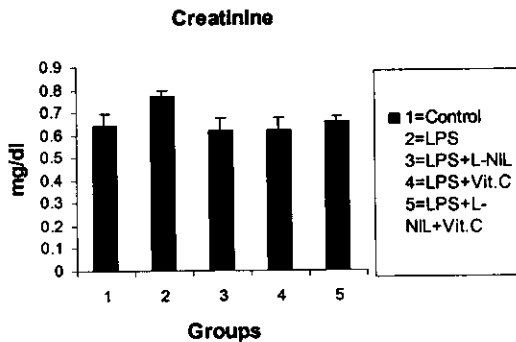
غلظت ویتامین E در کلیه برحسب نانومول به ازاء گرم بافت در گروه کنترل،  $11/11 \pm 0/19$ ، در گروه LPS  $10/61 \pm 0/15$ ، در گروه LPS + ویتامین C  $10/43 \pm 0/24$  و در گروه LPS + ویتامین C + L-NIL  $14/40 \pm 0/17$  می باشد. در این نمودار گروه LPS با  $(P < 0.001)$  کاهش در مقدار ویتامین E نسبت به گروه کنترل نشان می دهد و گروه ترکیب توأم ویتامین C و L-NIL نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری در مقدار ویتامین E را نشان می دهد  $(p < 0.001)$ . گروه های LPS + ویتامین C و LPS + ویتامین C + L-NIL نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد.

تغییرات غلظت BUN، کراتینین و لاکتات دهیدروژناز سرم

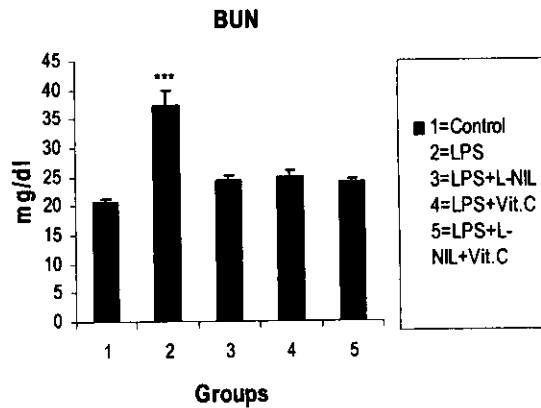
نمودار ۴ میانگین و خطای معیار BUN سرم را در گروه های کنترل، LPS، LPS + L-NIL، LPS + ویتامین C و LPS + ویتامین C + L-NIL + ویتامین C را نشان می دهد. میانگین غلظت BUN در گروه کنترل  $165 \pm 0/69$

۰/۶۵ می‌باشد که تفاوت معنی داری بین گروه‌ها مشاهده

نمی‌شود



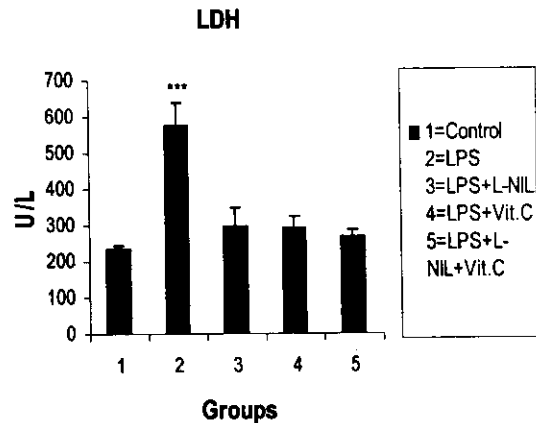
نمودار ۶- مقایسه میانگین و خطای معیار کراتینین سرم در گروه‌های کنترل، LPS، LPS+L-NIL، LPS+Vitamin C، LPS+L-NIL+Vitamin C بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر



نمودار ۴- مقایسه میانگین و خطای معیار BUN سرم در گروه‌های کنترل، LPS، LPS+L-NIL، LPS+Vitamin C، LPS+L-NIL+Vitamin C بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر

## بحث

سپتی‌سمی که با مرگ و میر بالا همراه است معمولاً با نارسایی ریوی، کبدی و کلیوی همراه می‌شود. گرچه هیپوتانسیون و کاهش جریان خون کلیوی در نارسایی کلیه نقش دارد. اما در مدل‌های حیوانی مشاهده شده که LPS حتی در غیاب افت قابل توجه فشار خون سیستمیک می‌تواند آسیب کلیوی ایجاد کند. جزء آسیب رساننده LPS که موجب نارسایی کلیه می‌شود لیپید A نامیده می‌شود که تولید نیتریک اکساید را سبب شده و موجب آسیب اکسیدان به توپول‌های پروگزیمال می‌شود. نیتریک اکساید عامل پاتولوژیک مهم در آسیب کلیوی می‌باشد. استفاده از مهارکننده‌های غیراختصاصی نیتریک اکسید موجب بدتر شدن شوک سپتیک می‌شود چون موجب انقباض عروق قلب، کاهش برون‌ده قلبی و افزایش فشار ریوی و ترومبوز کلیوی می‌شود. بدین ترتیب مهار eNOS در عوارض فوق‌نقش دارد در حالیکه مهار اختصاصی iNOS می‌تواند مفید واقع شود به نظر می‌رسد LPS به رسپتور غشایی خود متصل می‌شود و پروتئین کیناز فعال‌کننده میتوزن (MAPK) را



نمودار ۵- مقایسه میانگین و خطای معیار LDH سرم در گروه‌های کنترل، LPS، LPS+L-NIL، LPS+Vitamin C، LPS+L-NIL+Vitamin C بر حسب واحد در لیتر. نمودار ۶ میانگین و خطای معیار کراتینین سرم را در گروه‌های کنترل، LPS، LPS+L-NIL، LPS+Vitamin C، LPS+L-NIL+Vitamin C می‌دهد. میانگین و خطای معیار کراتینین در گروه کنترل ۰/۶۵ ± ۰/۰۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر، در گروه LPS ۰/۷۷ ± ۰/۰۲۵، در گروه LPS+L-NIL ۰/۶۲ ± ۰/۰۵ و در گروه LPS+Vitamin C ۰/۶۳ ± ۰/۰۲۵، در گروه LPS+L-NIL+Vitamin C ۰/۶۲ ± ۰/۰۲۵

اختلال عملکرد کلیه و صدمات ناشی از ایسکمی ری - پرفیوژن در مطالعه خود مشاهده نمودند.

L-NIL با حذف NO تولید پراکسی نیتريت را مهار می‌کند. پراکسی نیتريت در انواع آسیب سلولی که توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن میانجی‌گری می‌شود شرکت دارد. متعاقب تزریق LPS القاژن iNOS اتفاق افتاده و مقادیر فراوانی NO تولید می‌شود. انواع سلولی مسئول تولید NO و سوپراکسید در کلیه در پاسخ به LPS هنوز شناخته نشده است. Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۲) بیان می‌کنند که cNOS و iNOS سلول‌های پروگزیمال هر دو قادر به تولید سوپراکسید و NO هستند و این اعتقاد برخلاف نظر سایرین می‌باشد که معتقدند پس از القا iNOS و ترشح فراوان NO در واقع با مهار cNOS صدمات بافتی اتفاق می‌افتد. چنانچه Schwartz و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۲۵) بیان می‌کنند که مقادیر کمی از NO برای مهار cNOS در مقایسه با iNOS مورد نیاز است. Narita و همکاران در سال ۱۹۹۵ (۲۸) بیان می‌کنند که پراکسی نیتريت بجز صدمات سلولی خودبخودی می‌تواند با تولید مقادیر فراوان رادیکال OH<sup>°</sup> که واکنشی و توکسیک می‌باشد باعث آسیب سلولی شود که آنان در تحقیق خود گلوپروولونفریت را ناشی از رادیکال‌های فوق می‌دانند.

LPS سبب تولید رادیکال‌های آزاد و نارسایی کلیه می‌شود (۱۶،۲). کاهش ویتامین E کلیه توسط LPS مؤید این مطلب است. LPS یک محیط اکسیدان ایجاد کرده و سیستم آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با این تهاجم برانگیخته می‌شود در مورد ویتامین E پلاسما نیز این قضیه صادق است.

ویتامین C خود یک Scavenger قوی رادیکال‌های آزاد می‌باشد که آنیون سوپراکسید، هیدروکسیل، پراکسی نیتريت، پراکسیل آبی، اکسیژن تک، ازن، نیتروژن دی‌اکسید، رادیکال‌نیترواکسید و اسید هیپوکلروس را رفته‌گری می‌نماید. در واقع ویتامین C مهمترین آنتی‌اکسیدان مایعات خارج سلولی است که با خاصیت برداشت رادیکال‌های آزاد پراکسیداسیون چربی را

فعال می‌کند. این امر سبب فعال شدن NF-KB میگردد که در حالت طبیعی به شکل غیرفعال در سیتوپلاسم وجود دارد. LPS باعث انتقال NF-KB به هسته شده و سبب القای iNOS می‌گردد (۲۳). افزایش BUN توسط LPS که ناشی از کاتابولیسم پروتئین‌ها و به عنوان یک شاخص اندوتوکسمی (۲) و اندکس عملکرد کلیوی است، در تمام بیماری‌های کلیه بالاتر از حد طبیعی می‌باشد از آن جمله می‌توان گلوپروولونفریت، پیلونفریت، نکروز حاد توبولی و انسداد مجرای ادراری را نام برد (۱۹). مقالاتی که سطوح نیتريت، نیتترات، MDA و یا دیگر شاخص‌های استرس اکسیداتیو را سنجیده‌اند آسیب کلیوی پس از تزریق LPS را گزارش کرده‌اند. بنظر می‌رسد تولید رادیکال سوپراکسید در پاسخ به LPS موجب صدمه به کلیه، ریه و کبد می‌شود زیرا رادیکال سوپراکسید می‌تواند با نیتريك اکساید ترکیب شده، تحت واکنش اضافه شدن دو رادیکال، آنیون قوی پراکسی نیتريت را تشکیل دهد (۲). L-NIL که یکی از مهارکننده‌های اختصاصی iNOS است بخوبی می‌تواند کاتابولیسم پروتئین و استرس اکسیداتیو در کلیه را کاهش داده (۲) و عملکرد کلیه را بهبود بخشد (۲۴). چنانچه این وضعیت را در این مطالعه در گروه L-NIL+LPS و در گروه ترکیب توأم L-NIL و ویتامین C مشاهده کردیم در واقع کاهش BUN اثر مفید L-NIL بر عملکرد کلیه را نشان می‌دهد. اثرات مفید L-NIL در کاهش BUN توسط Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۲)، Schwartz و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۲۵) گزارش شده است که همگی از عدم تشکیل پراکسی نیتريت بدنبال مهار iNOS و مهار ترشح نیتريك اکسید گزارش می‌کنند. در مطالعات مشابه دیگر از قبیل Schwartz و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۱۴) و Gabbai و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۲۶) اثرات مفید L-NIL را در جلوگیری از کاهش GFR پس از تزریق LPS گزارش نموده‌اند. همچنین Chatterjee و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۲۷) اثرات مفید L-NIL را در کاهش



شده است پلاسما و کبد از مخازن متغیر و بافت چربی از مخازن ثابت ویتامین E به شمار می آیند. در مواقع لزوم که استرس اکسیداتیو مهمترین آن است ویتامین E از بافت های متغیر مهاجرت کرده و نیاز بافت هایی چون کلیه و ریه را برای مقابله با استرس اکسیداتیو برطرف می کند (۲۱).

LPS نتوانست تفاوت معنی داری در مقدار کراتینین ایجاد کند. این نتیجه در مورد کراتینین در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۲) و Raina و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۳) نیز بدست آمد و آنها نیز تفاوت معنی داری در مقدار Cr سرم مشاهده نکردند با توجه به مدت آزمایش در مطالعه Zhang و همکاران که ۶ ساعت بود و مطالعه ما که ۸ ساعت بوده است بنظر می رسد مدت زمان بیشتری برای افزایش Creatinine لازم است.

همانطور که در فصل نتایج مشاهده شد LPS توانست سطح LDH سرم را به میزان قابل ملاحظه ای افزایش دهد. LDH سرم از آنزیم هایی است در بافت های مختلف از قبیل قلب، کبد، کلیه ها، عضله اسکلتی، مغز و ریه ها موجود است و ایزوآنزیم LDH-4 اختصاصاً در کلیه ها موجود است (۳۲). حضور این آنزیم در سیتوسول بوده و فعالیت آن در کلیه بیش از پانصد برابر میزان فعالیت نرمال آنزیم در سرم است بنابراین صدمه به کلیه موجب افزایش این آنزیم در مایعات فیزیوپوژیک بدن می شود. یکی از موارد افزایش LDH و پیلونفریت می باشد (۳۳). افزایش LDH در این مطالعه مشابه نتیجه ای است که Raina و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۳) بدست آوردند.

مهارمی کند. همین خاصیت می تواند موجب کاهش LDH, BUN سرم در مطالعه ما شده باشد. همانطور که در فصل نتایج مشاهده شد LPS با کاهش ویتامین E کلیه و پلاسما در واقع موجب استرس کسیداتیو و آسیب کلیوی شده است. میزان ویتامین E کلیه و پلاسما در گروه L-NIL+LPS و vitamin C + LPS تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت و این می تواند ناشی از اثرات با ارزش آنتی اکسیدانی ویتامین C و مهار NO توسط L-NIL می باشد. همچنین ویتامین C بر ویتامین E اثر سینرژیستی دارد و در واقع موجب رژنراسیون و احیای ویتامین E می شود. recycling آلفا توکوفرول توسط آسکوربیت غشاءهای چربی را در برابر پراکسیداسیون محافظت می کند (۲۹، ۳۰).

در گروه LPS + ویتامین L-NIL+C همانطور که در فصل نتایج مشاهده شد ویتامین E پلاسما و کلیه افزایش یافته بود. این نتیجه می تواند مربوط به اثر سینرژیستی و recycling ویتامین C بر ویتامین E و مهار دومسیر تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتریک اکسید باشد. نتیجه مشابهی در مطالعه Siman و Eriksson در سال ۱۹۹۷ (۳۱) بدست آمد که آنها نیز در تحقیق خود مشاهده کردند که تجویز ویتامین C افزایش غلظت ویتامین E بافت جفت و کاهش TBAR را در سرم موش های دیابتی باردار سبب می شود. و باز نتیجه مشابهی در مطالعه Mehmet Cay و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۲۹) بدست آمد که سطح ویتامین E کبد و پلاسما پس از تجویز ویتامین C در موش های دیابتی (یک وضعیت استرس اکسیداتیو) حتی نسبت به گروه کنترل نیز افزایش نشان داد و آنها این اثر را ناشی از همان اثر recycling و احیای ویتامین E در حضور ویتامین C می دانند. برای ویتامین E دو مخزن ثابت و متغیر توصیف

## منابع

1. Ignarro Lj, Nitric oxide Biology and pathobiology. California. Academic Press. 2000. 780.
2. Zhang C, Walker LM, Mayeux PR. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide induced oxidant stress in the rat kidney. *Biochemistry Pharmacology*. 2000. 59: 203-209.
3. Raina N, Matsui J, Jeejeebhoy KN. Nutritional and metabolic effects of the endotoxin bacterial LPS in orally and parent rally fed rats. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000. 71(3): 835-843.
4. Dwairi QEL, Comtois A, Guo Y, et al. Endotoxin induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide syntheses. *American Journal of Physiology*. 1998. 770-779.
5. Porst M, Hartner A, Krause H, et al. Inducible nitric oxide syntheses and glomerular hemodynamics in rats with liver cirrhosis. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 2001. 181(2): 193-9.
6. Lortie MJ, Ishizuka SH, Schwartz D, et al. Bioactive products of arginine in sepsis: tissue and plasma composition after LPS and iNOS blockade. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 2000. 178(6): 1191-1199.
7. Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochemistry Biophysic Acta*. 1999. 5, 1411(2-3): 437-55.
8. Wang W, Falk SA, Jittikanont S, et al. Protective effect of renal denervation on normotensive endotoxemia- induced acute renal failure in mice. *American Journal of Physiol. renal physiology*. 2002. 183(3): 583-7.
9. Suntres ZE, Shek PN. Treatment of LPS induced tissue injury: role of liposomal antioxidants. *Shock*. 1996. 6 Suppl 1: 557-564.
10. Mccal MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radicals Biology Med*. 1999. 26 (7,8): 1034-1053.
11. Vatassery GT, Smith WE, and Quach HT. Alpha tocopherol in rat brain subcellular fractions is oxidized rapidly during incubations with low concentrations of peroxyntirite. *Journal of Nutrition*. 1998. 118:152-157.
12. Rumsey SC, Wang Y, Levine M. Vitamin C in: antioxidant status diet nutrition and health. *Papas. AM. CRC press. Massachusetts*. 1999. 159-248
13. Preiser JC, Zhang H, Vray B, et al. Time course of inducible nitric oxide synthase activity following endotoxin administration in dogs. *Nitric oxide: Biology and chemistry*. 2001. Vol 5. No 2. 208- 211.
14. Schwartz D, Brasowski E, Raskin Y, et al. The outcome of non-selective vs selective nitric oxide synthase inhibition in LPS treated rats. *Journal of Nephrology*. 2001. 14 (2):110-114.
15. Schwartz D, Blantz RC. Nitric oxide, sepsis, and the kidney. *Semin Nephrol*. 1999. 19(3): 172-6.
16. Crespo E, Macias M, Pozo D, et al. Melatonin inhibits expression of inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Faseb J*. 1999. 13(12):1537-1546.
17. Stefan F, Kai Z, Gillian M.W, et al. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as anovel nitric oxide- regulated gene in rat glomerular mesangial cells and kidneys of endotoxemic rats. 1999. 13: 869-882.
18. Rhyu DY, Yokozawa T, Choa EJ, et al. Prevention of peroxyntirite-induced renal injury through modulation of peroxyntirite production by the Chinese prescription Wen-Pi-Tang. *Free Radic Res*. 2002. 36(12): 1261-9.

19. Yokozawa T, Rhyu DY, Chen CP. Protective effects of *Acanthopanax Radix* extract against endotoxemia induced by lipopolysaccharide. *Phytother Res*. 2003. 17 (4):353-7.
20. Arnaud J, Furtis I, Blacher S, et al. Simultaneous determination of retinol, alpha tocopherol & beta carotene in serum by isocratic high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 1991. 572: 103-116.
21. Basu TK, Dickerson JW. Vitamins in human health and disease. *cab international*. 1996. 214 - 167.
22. Peng Y, Peng YM. Simultaneous liquid chromatographic determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human buccal mucosal cells. *Cancer Epidemiologic Biomarker and prevention*. 1992. 2: 375-382.
۲۳. قاسمی ا. تعیین میزان تغییرات ویتامین E در پلاسما و کلیه موش صحرایی در آسیب کلیوی ناشی از لیپولی ساکارید. پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. ۱۳۸۰؛ ۷۲.
24. Noiri E, Nakao A, Uchida K, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *AM J Physiol*. 2001. 181(5): F 948-57.
25. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, et al. Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after LPS administration provokes renal dysfunction in rats. *The Journal of clinical investigation*. 1997. Vol 100. No 2. 439-448.
26. Gabbai FB, Hammond TC, Thomson SC, et al. Effect of acute iNOS inhibition on glomerular function in tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int*. 2002. 61(3): 851-4.
27. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2002. 61(3): 862-71.
28. Narita I, Border WA, Ketteler M, et al. Nitric oxide mediates immunologic injury to kidney mesangium in experimental glomerulonephritis. 1995. 72, No 1. 17.
29. Mehmet C, Mustafa N, Halil S, et al. Effects of intraperitoneally administered vitamin C on antioxidative defense mechanism in rats with diabetes induced by streptozocin. *Research Experimental Medicine*. 2001. 200: 205- 213.
30. Rinne T, Mutschler E, Wimmer-Greinecker G, et al. Vitamin C and E protect isolated cardio myocytes against oxidative damage. *Int J Cardiology*. 2000. 15, 75 (2-3): 175-181.
31. Siman CM, Eriksson UJ. Vitamin C supplementation of the maternal diet reduces the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia*. 1997.40: 1416-1424.
۳۲. بلورچی فرد ف. و همکاران. مطالعات آزمایشگاهی و روش‌های تشخیصی. تهران: نور دانش، ۱۳۷۸؛ ۱۶.
۳۳. امیررسولی ه. بیوشیمی بالینی. جعفری، تهران. ۱۳۷۰؛ ۷۱.