

Effects of Silibinin on Nitric Oxide Synthase Genes Expression during Hepatic Warm Ischemia-reperfusion in Adult Male Rats

Ehsan nabipour¹,
Vahid Akbari Kordkheyl²,
Soheil Azizi³,
Abbas Khonakdar-Tarsi⁴

¹ MSc in Biochemistry, Department of Biochemistry-Genetic and Plant Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

² MSc in Clinical Biochemistry, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Laboratory Medicine, Faculty of Allied Medical Sciences, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Biochemistry-Biophysics and Genetics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 4, 2017 ; Accepted July 16, 2018)

Abstract

Background and purpose: Ischemia-reperfusion injuries (I/RI) are the major causes of liver failure after various types of liver surgeries, particularly liver transplantation. Reactive oxygen species (ROS) are the major causes of such injuries, therefore, antioxidant therapy to attenuate hepatic lesions is preferred. We aimed to evaluate the effects of silibinin, a potent radical scavenger, on liver damages and endothelial and inducible nitric oxide synthase (eNOS and iNOS) genes expression after liver I/R.

Materials and methods: In this experimental study, the rats were divided into four groups (n=8 per group). Group1 Vehicle: the rats underwent laparotomy and received DMSO10%, Group 2 SILI: the animals received silibinin alongside laparotomy, Group3 I/R: the rats received DMSO10% and subjected to liver I/R procedure, and group 4 I/R+SILI: this group received both silibinin and liver I/R simultaneously. Silibinin (50 mg/kg I.P) was administered twice in all rats. After 1 h ischemia and 5 h reperfusion, blood samples were collected to evaluate serum AST and ALT levels and liver sections were taken to analyze the eNOS and iNOS gene expressions and histological examinations.

Results: There were no significant differences in all parameters between Vehicle and SILI groups ($p>0.05$). But serum AST and ALT increased significantly in I/R group compared with those in vehicle group. Treatment with silibinin could considerably reduce these markers. Histological damages during I/R improved by silibinin. The iNOS gene was found to be overexpressed whereas eNOS expression decreased in I/R group compared with those in the vehicle group. Silibinin treatment could decline iNOS expression but could not significantly affect eNOS expression ($p>0.05$).

Conclusion: Silibinin protects liver from I/RI. It may decrease iNOS adverse effects by suppressing its expression.

Keywords: Ischemia-reperfusion, eNOS, iNOS, silibinin

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (164): 1-12 (Persian).

* Corresponding Author: Abbas Khonakdar-Tarsi - Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: khonakdarab@gmail.com)

اثرات سیلیبیین بر بیان ژن های نیتریک اکساید سنتاز طی ایسکمی-ریپرفیوژن گرم کبدی در رت های بالغ نر

احسان نبی پور^۱
وحید اکبری کردخیلی^۲
سهیل عزیزی^۳
عباس خنکدار طارسی^۴

چکیده

سابقه و هدف: آسیب های ایسکمی-ریپرفیوژن (I/R) کبدی، علت اصلی نارسایی کبد در جراحی های مختلف به خصوص پیوند کبد می باشد. از آنجایی که ROS علت عمده آسیب های کبدی است، به کارگیری آنتی اکسیدان ها برای کاهش این عوارض در اولویت قرار دارد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات سیلیبیین بر آسیب های کلی بافت کبد و بیان ژن های *eNOS* و *iNOS* (نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و القایی) طی I/R انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، رت ها به چهار گروه هشت تایی، شامل گروه حامل (Vehicle) که رت ها مورد عمل لاپاراتومی قرار گرفته و حامل (DMSO 10%) دریافت کردند، گروه SILI که رت ها همراه لاپاراتومی، سیلیبیین دریافت کردند، گروه I/R که رت ها مورد عمل I/R قرار گرفته و حامل دریافت کردند و گروه I/R+SILI که رت ها همزمان با I/R سیلیبیین دریافت کردند، تقسیم شدند. سیلیبیین در گروه ها برای هر رت دو بار، هر بار با دوز ۵۰ mg/kg (I.P) تزریق گردید. پس از یک ساعت ایسکمی و ۵ ساعت ریپرفیوژن، نمونه های خون برای سنجش AST و ALT سرم و نمونه های کبد برای ارزیابی بیان ژن های *eNOS* و *iNOS* و بررسی های بافت شناسی جمع آوری شدند.

یافته ها: بین گروه های Vehicle و SILI در کلیه پارامترها، تغییر معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). سطوح AST و ALT سرم در گروه I/R افزایش چشمگیری نسبت به گروه حامل داشت، که توسط سیلیبیین کاهش قابل توجهی پیدا کرد. همچنین آسیب های بافتی مشاهده شده در گروه I/R توسط سیلیبیین بهبود پیدا کرد. بیان ژن های *eNOS* و *iNOS* طی I/R به ترتیب افزایش و کاهش بارزی در مقایسه با گروه حامل داشت. درمان با سیلیبیین توانست بیان *iNOS* را کاهش دهد اما نتوانست اثر معنی داری روی بیان *eNOS* بگذارد ($p > 0.05$).

استنتاج: سیلیبیین اثرات حمایتی روی کبد طی I/R از خود نشان داده و می تواند با کاهش بیان *iNOS*، از اثرات مضر آن بکاهد.

واژه های کلیدی: ایسکمی-ریپرفیوژن، نیتریک اکسید سنتاز، سیلیبیین

مقدمه

ایسکمی ریپرفیوژن (I/R) پدیده آسیب رسانی است که در اثر قطع موقتی جریان خون یک عضو، رفع انسداد و بازگشت جریان خون به آن عضو رخ می دهد. با توجه به این که ۷۵ درصد خون مورد نیاز کبد از ورید

E-mail: khonakdarab@gmail.com

مؤلف مسئول: عباس خنکدار طارسی- ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی

۱. کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی ژنتیک و زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد دامغان، دامغان، ایران

۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۱/۲۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۴/۲۵

پورت و تنها ۲۵ درصد خون آن از شریان کبدی غنی از اکسیژن تامین می‌شود، کبد بیشتر مستعد آسیب‌های I/R می‌باشد (۱). ایسکمی ریپرفیوژن کبدی در مواقع بالینی متعددی از جمله، تروما، شوک هموراژیک، سپسیس، تومور و جراحی‌های اساسی نظیر بیوپسی و پیوند کبد رخ می‌دهد. فاکتور هایی مانند گرسنگی، کبد چرب، سن، زمان و شدت و سرعت ایسکمی و ریپرفیوژن در میزان آسیب‌ها تاثیر گذار می‌باشد (۲). آسیب‌های ناشی از I/R کبدی با مکانیسم‌های مولکولی مختلف رخ می‌دهند که می‌توان به این موارد اشاره کرد: تهی شدن سلول از ATP به دلیل نبود اکسیژن که باعث اختلال در pH، تبادلات غشایی و ادم سلولی می‌شود، آسیب به جریان خون عروق کوچک به خصوص انقباض سینوزوئیدها که به دلیل تغییر در بیان ژن‌های تنظیم کننده انقباض و انبساط عروق رخ می‌دهد و پدیده عدم جریان مجدد را باعث می‌شود و پاسخ التهابی ناشی از فعال شدن سلول‌های کوپفر و تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن (ROS) و سایتوکاین‌ها که پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌های مختلف سبب می‌شود. همچنین سایتوکاین‌ها می‌توانند کموتاکسی نوتروفیل‌ها را در فاز تاخیری، و سندرم پاسخ التهابی سیستمیک و در نتیجه آسیب ارگان‌های دور مثل مغز، ریه و کلیه نیز سبب شوند (۳-۵). جلوگیری از آسیب جریان خون عروق کوچک یکی از اهداف اصلی در کاهش آسیب‌های I/R بوده، مداخله در بیان ژن‌های دخیل در تنظیم انقباض و انبساط عروق، استراتژی مناسبی در نیل به این هدف می‌باشد. نیتریک اُکساید (NO) به عنوان متسع کننده و اندوتلین ۱ (ET-1) به عنوان تنگ کننده رگ، در تنظیم جریان خون میکروسکوپی کبد اهمیت زیادی دارند. در آسیب ایسکمی، افزایش ET-1 و به دنبال آن انقباض سینوزوئیدها، کاهش جریان خون کبدی طی ریپرفیوژن یا ریپرفیوژن غیر موثر را سبب می‌شود (۶). در کبد، رادیکال NO توسط نیتریک اُکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) یا نیتریک اُکساید سنتاز القایی (iNOS) تولید می‌شود و این در حالی است

که eNOS تنها در سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی بیان دائمی دارد. بیان iNOS عمدتاً در سلول‌های التهابی به طور القایی تنظیم می‌شود. به طور معمول پذیرفته شده است که طی I/R، NO مشتق از eNOS از طریق انبساط عروق، کاهش چسبندگی و تجمع نوتروفیل‌ها و پلاکت‌ها و ممانعت از انقباض سلول‌های ستاره‌ای کبدی، حفظ سیالیت خون را موجب می‌شود و اما، NO اضافی حاصل از عمل iNOS در شرایط التهابی، با ترکیبات رادیکالی از جمله سوپر اکسید واکنش می‌دهد و رادیکال خطرناک پروکسی نیتريت (استرس نیتروژاتیو) را تولید می‌نماید (۷). همراه با ریپرفیوژن و برقراری جریان خون و اکسیژن، ROS به مقدار فراوان در بافت ایسکمیک تولید می‌شود. توانایی این مولکول‌های فعال در ایجاد آسیب استرس اکسیداتیو و فعال کردن مسیرهای پیام رسانی و در نهایت تولید مازاد پاسخ التهابی سبب آپوپتوز و نارسایی جریان خون عروق کوچک می‌شود، بنابراین ROS و RNS از اهمیت زیادی در آسیب‌های کبد طی I/R برخوردار هستند و به همین دلیل، زدایندهای رادیکال آزاد برای کاهش این آسیب‌ها مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند (۸). سیلیمارین، ۸۰-۷۰ درصد از عصاره دانه گیاه خار مریم^۱ را تشکیل می‌دهد و از دیرباز به عنوان حمایت کننده کبد شناخته شده است. در سال اخیر بیش از ۵۰۰ مقاله روی اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی مختلف از سیلیمارین و محتویات آن منتشر شده است. ترکیبات مختلفی مثل، سیلینین A و B، سیلیکریستین، سیلیدیانین، تاکسیفولین و کوئرستین از سیلیمارین جداسازی شده‌اند. سیلینین یا ترکیب سیلینین A و B فلاونوئیدگانی است که ۸۰-۷۰ درصد از سیلیمارین را تشکیل می‌دهد و ماده موثر اصلی آن می‌باشد (۹). تصویر شماره ۱ ساختار سیلینین را نشان می‌دهد. گزارش شده است که سیلینین از طریق جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد به خصوص به وسیله حلقه C، افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نیز تحریک

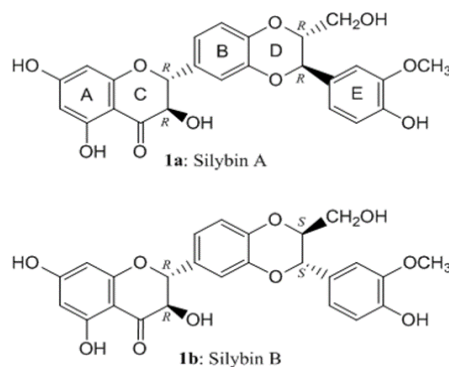
1. Silybum marianum

تاریکی ۱۲ ساعته و در اتاق دارای تهویه مناسب نگهداری شدند. آب و رژیم غذایی طبیعی به صورت دائمی در اختیار آن‌ها قرار داده شد. یک هفته قبل از شروع آزمایش، رت‌ها جهت مطابقت با محیط، به اتاق آزمایش منتقل شدند. رت‌ها به صورت تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی، گروه حامل، SILI، I/R، و گروه I/R + SILI تقسیم شدند. رت‌ها در گروه اول، حامل (Vehicle)، فقط مورد عمل لاپاروتومی قرار گرفته و ۱۰ درصد DMSO (حلال سیلیبینین) دریافت کردند. گروه دوم، SILI، رت‌ها مورد عمل لاپاروتومی قرار گرفته و سیلیبینین دریافت کردند. رت‌ها در گروه سوم I/R، طی I/R حامل (حلال سیلیبینین) دریافت کردند و گروه چهارم گروه SILI+I/R رت‌ها همراه با I/R سیلیبینین دریافت کردند.

روش ایجاد ایسکمی-ریپرفیوژن

کلیه مراحل کار با حیوانات تحت نظارت کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد. اعمال جراحی تحت شرایط استریل انجام گرفت و برای حذف اثرات مخدوش کننده، زمان همگی در ساعات ۸ تا ۱۴ انجام شدند. رت‌ها ۱۸ ساعت قبل از جراحی در حالت ناشتا قرار گرفته و تنها آب در اختیار آن‌ها قرار داده شد. برای بیهوشی عمومی از کتامین ۶۰ mg/kg و زایلازین ۸ mg/kg به صورت داخل صفاقی استفاده شد. برای القای ایسکمی، ابتدا برش روی خط میانی شکم انجام شد و کبد به کمک انگشتان دست بیرون آورده، تا عروق سه گانه پورت شامل شریان کبدی، ورید پورت و مجرای صفراوی قابل رویت شود. شاخه چپ عروق سه گانه، مربوط به لوب‌های چپ و میانی کبد به وسیله کلمپ فلزی بولداگ به مدت یک ساعت مسدود شدند. با این روش، ایسکمی کلی کبد به میزان ۷۰ درصد حاصل شد (۱۳). لوب راست و دمی برای جلوگیری از احتقان روده‌ای و گرفتگی عروق مزانتریک، جریان خون آزاد داشتند. در طول مدت ایسکمی، کبد با گاز استریل

فاکتور رونویسی آنتی اکسیدانی Nrf-2، ارتقا ظرفیت آنتی اکسیدانی بدن در شرایط استرس اکسیداتیو را سبب می‌شود (۱۰). سیلیبینین قادر است از طریق مهار فعالیت فاکتور رونویسی التهابی NF- κ B از مازاد پاسخ التهابی جلوگیری کند و همچنین اثرات ضد سرطانی سیلیبینین از طریق القای آپوپتوز و مهار فاکتورهای رشد به اثبات رسیده است (۱۱، ۱۲). با توجه به این که پاسخ التهابی، استرس نیتروژاتیو (ناشی از *iNOS*) و نارسایی جریان خون عروق کوچک (ناشی از تغییر بیان ژن‌های تنظیم کننده انقباض و انبساط عروق مثل *eNOS*) از مهم‌ترین علل آسیب‌های I/R کبدی می‌باشد و با توجه به این که سیلیبینین و سیلیمارین، اثرات ضد التهابی، آنتی اکسیدانی و توانایی تغییر بیان ژن‌ها در شرایط بالینی مختلف از خود نشان می‌دهند، در این مطالعه تاثیرات سیلیبینین روی بیان ژن‌های *eNOS* و *iNOS*، مقادیر سرمی AST و ALT و همچنین آسیب‌های بافتی کبد (مثل نفوذ و فعال شدن سلول‌های التهابی)، طی I/R کبدی در رت مورد بررسی قرار گرفت.



تصویر شماره ۱: ساختار سیلیبینین

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۳۲ رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۱۰ تا ۲۳۰ گرم که از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه گردید، مورد مطالعه قرار گرفت. این رت‌ها در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه، رطوبت ۵۰ تا ۵۵ درصد، سیکل روشنایی

درصد در دمای محیط تا شروع بررسی‌ها نگهداری شدند. برای آماده‌سازی بافت‌ها جهت بررسی‌های میکروسکوپی، بافت‌ها با آب شستشو داده شد تا مایع فیکساتیو خارج گردد، سپس دهیدراتاسیون با درجات مختلف الکل (۱۰۰-۵۰ درصد) انجام شد و بعد از آن در زایلن شفاف شدند. در نهایت در پارافین قرار داده و به قطعاتی به اندازه ۳-۵ میکرو متر با میکروتوم برش داده شد. قطعات در هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند.

بررسی بیان ژن های *eNOS* و *iNOS*

استخراج RNA کل از ۳۰ mg از بافت کبد که درون RNA LATER (شرکت کیاژن) در دمای °C ۷۰- نگهداری می‌شد، طبق پروتکل Qiagen, Ger RNeasy plus mini kit انجام شد. خلوص RNA استخراج شده با اسپکتروفوتو متری و نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ nm به ۲۸۰ بررسی گردید. این RNA ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد دارای سایبرگرین با اختلاف پتانسیل ۸۵ V، به مدت ۴۵ دقیقه ران شده و از لحاظ داشتن دو بانده مشخص مربوط به RNA ریوزومی ۱۸ S و ۲۸ S تایید شدند. cDNA نیز از ۵ µg از RNA کل استخراج شده طبق پروتکل Qiagen, Ger QuantiTect RT-PCR kit در کمتر از ۳۰ دقیقه ساخته شد. Real time PCR در حجم کلی ۲۵ µL، ۱۲/۵ µL مسترمیکس حاوی سایبرگرین (Amplicon-poland)، ۲ µL cDNA، پرایمر مستقیم و معکوس هر کدام ۰/۵ µL (طوری که غلظت نهایی کلیه پرایمرها ۱۰ µM شد) با دستگاه Rotor-Gene[®]Q انجام شد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها و طول قطعات محصولات

ژن	توالی پرایمر 3'→5'	طول محصولات (bp)
<i>iNOS</i>	Sense : TGGTGAGGGGACTGGACTTT Antisense: CCAACTCTGCTGTCTCCGT	207
<i>eNOS</i>	Sense : CAGGCTCTCAGTACTTCC Antisense: AACCACTTCCATCTTTCGTA	149
β -actin	Sense : 5'-CCCATCTATGAGGGTACGC-3' Antisense: 5'-TTTAATGTCACGCAGGATTC-3'	145

آغشته به سرم فیزیولوژی مرطوب نگهداشته شد. پس از یک ساعت ایسکمی، کلمپ به آهستگی برداشته و کبد به داخل حفره شکمی انتقال یافت. محل برش جراحی دوخته شد و ریپرفیوژن به مدت ۵ ساعت آغاز گردید. در طول این مدت هر زمان که نیاز بود، رت‌ها با کتامین دوباره بیهوش شدند.

تزریق سیلیبینین

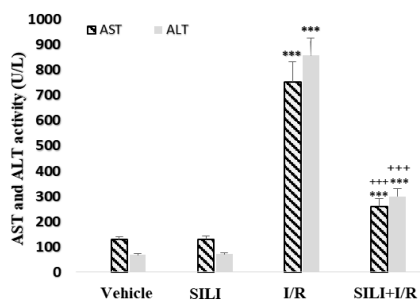
سیلیبینین با خلوص بیشتر از ۹۸ درصد به صورت لیوفیلیزه (شرکت سیگما) خریداری شد. این دارو به دلیل حلالیت بسیار کم در آب (۰/۵ gr/L)، ۱۰ دقیقه قبل از تزریق در DMSO ۱۰ درصد (در نرمال سالین) و در حجم نهایی ۰/۵ mL حل گردید. سیلیبینین دو بار، یک بار نیم ساعت قبل ایسکمی و بار دیگر بلافاصله پس از شروع ریپرفیوژن و هر بار ۵۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۶-۱۴).

سنجش *ALT* و *AST*

پس از ریپرفیوژن، نمونه های خون از ورید اجوف تحتانی، جمع آوری شد و به مدت بیست دقیقه جهت جدا شدن لخته، در دمای محیط قرار داده شد. جهت جدا سازی سرم، نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ rpm، به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت سرم‌ها تا زمان شروع آنالیزهای بیوشیمیایی در °C ۷۰- نگهداری شدند. سنجش فعالیت *ALT* و *AST*، سرم بر حسب (U/L) پس از ۲۴ ساعت از نمونه گیری در آزمایشگاه با دستگاه اسپکتروفوتومتر با استفاده از کیت پارس آزمون (کرج، ایران) انجام شد.

بررسی های بافت شناسی

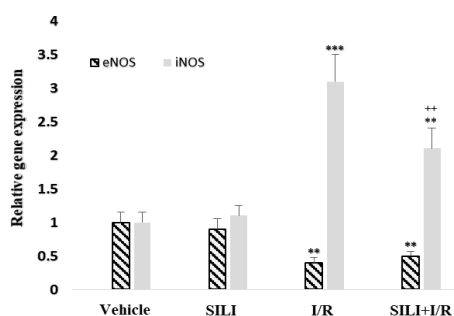
همزمان با خون گیری، قطعاتی از بافت کبد از لوب ایسکمی شده جهت بررسی های هیستولوژی گرفته شد و جهت خارج کردن خون و لخته، بلافاصله در سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. بافت‌ها در فرمالین ۱۰



نمودار شماره ۱: اثر سیلیبینین روی فعالیت آنزیم های AST و ALT سرم، پس از آنالیز کبدی. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین (mean \pm SEM) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شدند. *** اختلاف معنی دار نسبت به گروه حامل ($p < 0.001$) و +++ اختلاف معنی دار نسبت به گروه I/R ($p < 0.001$) را نشان می دهد.

نتایج Real time PCR

پس از آنالیز نتایج Real time PCR، مشخص شد که میزان mRNA ژن های *eNOS* و *iNOS* در گروه های Vehicle و SILI تفاوت چندانی نداشته است. اما در گروه I/R مقدار mRNA *eNOS* و *iNOS* نسبت به گروه Vehicle، به ترتیب کاهش ($p < 0.01$) و افزایش ($p < 0.001$) چشمگیری داشته است. درمان با سیلیبینین در گروه SILI+I/R توانست میزان بیان ژن *iNOS* را نسبت به گروه I/R کاهش دهد ($p < 0.01$) و این در حالی است که سیلیبینین توانست تاثیر معنی داری روی بیان ژن *eNOS* اعمال کند. نمودار شماره ۲، مقایسه نسبی بیان ژن های *eNOS* و *iNOS* را در در چهار گروه نشان می دهد.



نمودار شماره ۲: مقایسه نسبی بیان ژن های *eNOS* و *iNOS* در چهار گروه مورد مطالعه، نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین (mean \pm SEM) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شدند. *** اختلاف معنی دار نسبت به گروه حامل ($p < 0.001$) و *** اختلاف معنی دار نسبت به گروه حامل ($p < 0.001$) را نشان می دهند. +++ نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < 0.001$) نسبت به گروه I/R می باشد.

کلیه واکنش ها به صورت دوپلیکیت و در پروتکل دمایی، ۱۵ دقیقه در 95°C جهت فعال سازی آنزیم TAQ polymerase، سپس تا ۳۵ سیکل، ۲۰ ثانیه در 95°C (دنا تورا سیون)، ۳۰ ثانیه در 61°C (اتصال) و ۳۰ ثانیه در 72°C (تکثیر) انجام شد. دمای اتصال از طریق گرادیانت دمایی با PCR معمولی تعیین گردید. از ژن بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده و تغییرات بیان ژن ها نسبت به آن سنجش شد. محصولات Real time PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی سایبرگرین، در اختلاف پتانسیل ۸۵ V، به مدت ۴۰ دقیقه ران و باندها از لحاظ اختصاصی بودن بررسی شدند. نمودار دمای ذوب پرایمرها از لحاظ داشتن یک پیک تایید شدند و نتایج Real time PCR طبق فرمول ۱ آنالیز شدند.

فرمول ۱

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{test}) - \Delta Ct (\text{calibrator})$$

نتایج سنجش AST و ALT به صورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین (mean \pm SEM) بیان شدند. تفاوت میانگین گروه ها توسط آزمون ANOVA و SPSS-18 در نرم افزار Tukey multiple comparison test در نرم افزار ۱۸ تعیین و سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج سنجش AST و ALT

فعالیت آنزیم های AST و ALT سرم در گروه Vehicle و SILI تفاوت چندانی با هم نداشتند. در گروه I/R فعالیت این آنزیم ها نسبت به گروه حامل افزایش چشمگیری داشت ($p < 0.001$) و در گروه SILI+I/R، سیلیبینین توانست فعالیت این آنزیم ها را به صورت قابل توجهی ($p < 0.001$) نسبت به گروه I/R کاهش دهد هر چند میزان آن به سطح گروه حامل نرسید. نمودار شماره ۱، اثر سیلیبینین روی فعالیت آنزیم های AST و ALT سرم، پس از I/R کبدی را نشان می دهد.

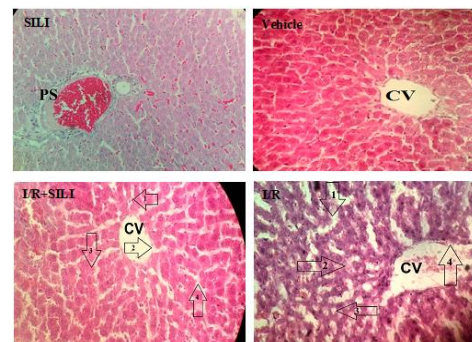
نتایج بررسی های بافت شناسی

بحث

عوارض I/R کبدی، علت ۸۱ درصد از عدم عملکرد یا عملکرد نا صحیح کبد پس از پیوند می باشند (۱۷). پاتوژنز آسیب های I/R کبدی چند عاملی، پیچیده و شامل تهی شدن سلول از ATP، استرس اکسیداتیو، آسیب جریان خون عروق کوچک و پاسخ التهابی می باشد که ممکن است در نهایت به پاسخ التهابی سیستمیک، آسیب ارگان های دورتر و رد حاد پیوند منجر شود (۱۸، ۱۹). این آسیب ها در زمان ریپرفیوژن به علت برقراری جریان خون و تحویل اکسیژن و تشکیل ROS شدیدتر می شوند. طی I/R همانند سایر شرایط استرس اکسیداتیو، ROS نقش اصلی را در بروز آسیب ها دارند. شواهد زیادی وجود دارند که نشان می دهند، کاهش آسیب های I/R کبد به میزان قرار گرفتن در معرض آنتی اکسیدان بستگی دارد. سطح آنتی اکسیدان های طبیعی خون مثل سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و پاراکسوناز به دلیل افزایش سطح ROS کاهش می یابد، در نتیجه آنتی اکسیدان درمانی یک استراتژی خوب برای کاهش آسیب های I/R می باشد (۲۰، ۲۱). سیلیبین ترکیبی از نسبت مساوی سیلیبین A و B و ۸۰ درصد ماده تشکیل دهنده سیلیمارین می باشد و نقش عمده ای در بروز خواص بیولوژیک سیلیمارین دارد. علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی، مطالعات نشان داده اند که سیلیبین از طریق مهار بیان فاکتور رونویسی NF- κ B و در نتیجه کاهش سطح TNF- α ، PGE2، IL-1 β اثرات ضد التهابی زیادی از خود نشان داده است (۲۲). اثرات ضد سرطانی سیلیبین روی ریه، پروستات، مثانه و تیروئید نیز اثبات شده است (۲۳، ۲۴).

در مطالعه حاضر سیلیبین توانست میزان AST و ALT سرم را که در شرایط I/R افزایش چشمگیر داشت، تا حد قابل توجهی کاهش دهد. این آنزیم ها در اثر افزایش ROS طی I/R و به دنبال آن پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین های غشای سلول های پارانشیم کبد آزاد می شوند. در مطالعات دیگر نشان داده شد که

بررسی های میکروسکوپی لام های تهیه شده از بافت کبد، نشان داد که گروه های Vehicle و SILI، ساختار بافتی سالمی داشته و اندوتلیوم سینوزوئیدها و ورید مرکزی، سالم بوده است. در گروه I/R، پارانشیم کبد به صورت کلی آسیب دید. قرینگی دو طرفه هپاتوسیت ها، اطراف ورید مرکزی از بین رفت و اتساع وسیع سینوزوئیدها مشاهده گردید. سلول های کوپفر، فعال و متراکم بودند و نفوذ و تجمع نوتروفیل ها در سینوزوئیدها و اطراف ورید مرکزی دیده شد. واکنش های سیتوپلاسمی و دژنراسیون هپاتوسیت ها در چندین مورد مشاهده شد و کانون های نکروز به ندرت و تنها در ناحیه ۳ بافت کبد دیده شد. در گروه I/R+SILI، گسترش سینوزوئیدها، نفوذ نوتروفیل ها و فعال شدن سلول های کوپفر نسبت به گروه I/R شدت کمتری داشت و هپاتوسیت ها و سلول های اندوتلیال مورفولوژی سالم تری داشتند. دژنراسیون و واکنش های سیتوپلاسمی در موارد محدود و نکروز سلولی اصلا دیده نشد. تصویر شماره ۲، مقایسه تصاویر بافت شناسی در چهار گروه را نشان می دهد.



تصویر شماره ۲: مقایسه تصاویر بافت شناسی در چهار گروه مورد مطالعه. گروه Vehicle: ساختار بافتی و ورید مرکز لوبولی سالم هستند (ورید مرکز لوبولی: CV)، گروه SILI: ساختار بافتی و فضای پورت سالم هستند (فضای پورت: PS). در گروه I/R: ۱: اتساع وسیع سینوزوئیدها، ۲: دژنراسیون آبی شدید، ۳: واکنش های سیتوپلاسمی و ۴: تخریب اندوتلیوم مشاهده می شود. در گروه I/R+SILI: ۱: تعداد سلول های کوپفر فعال، ۲: آسیب اندوتلیوم، ۳: دژنراسیون آبی و ۴: اتساع سینوزوئیدها کاهش یافته است. تصاویر با میکروسکوپ نوری Nikon و با بزرگنمایی ۲۰۰ \times تهیه شده است

افزایش آن‌ها با افزایش زمان ریپرفیوژن نیز بیش‌تر می‌شود و پیک سرمی آن‌ها دوازده ساعت پس از ریپرفیوژن است (۲۵). به نظر می‌رسد که سیلیبیین با خنثی سازی حجم زیادی از ROS توانست تا حدودی باعث پایداری غشا و در نتیجه کاهش سطح AST و ALT سرم شود (۲۶). بررسی‌های بافت شناسی مطالعه حاضر نشان داد که آسیب‌های بافت کبد مثل نفوذ و تجمع نوتروفیل‌ها، فعال شدن سلول‌های کوپفر، و اکوتلیزاسیون سیتوپلاسمی و گسترش سینوزوئیدها مشاهده شده در گروه I/R، با تزریق سیلیبیین تا حدودی کاهش یافته است. پاسخ التهابی یکی از علل اصلی این آسیب‌ها می‌باشد. طی ایسکمی DAMPs از سلول‌های آسیب دیده آزاد می‌شود که باعث فعال شدن سلول‌های کوپفر در فاز حاد می‌شود و هم‌چنین، این سلول‌ها با تولید ROS (به خصوص از طریق میلوپراکسیداز) و سایتوکاین‌هایی مثل TNF- α و IL-1 باعث جذب شیمیایی نوتروفیل‌ها و پلاکت‌ها در فاز تاخیری می‌شوند که افزایش تولید ROS (به خصوص از طریق NADPH اکسیداز) و سایتوکاین‌های التهابی مثل IL-8 از این سلول‌ها را به همراه دارد. این وقایع باعث فعال شدن بیش‌تر سلول‌های کوپفر می‌شود. بنابراین سلول‌های التهابی اثرات یکدیگر را تقویت می‌کنند (۲۷). مقدار زیاد ROS تولید شده باعث دژنراسیون، آسیب اندوتلیوم و نکروز می‌شود که در بررسی‌های میکروسکوپی بافت کبد مشاهده شده است. به نظر می‌رسد سیلیبیین با کاهش سطح فاکتورهای التهابی، ROS و افزایش ساخت پروتئین که در مطالعات گذشته به اثبات رسیده است، اثرات حمایتی در برابر آسیب‌های پارانشیم کبد از خود نشان داده است (۲۸، ۲۹). اندوتلیوم عروق مستقیماً در معرض نیروی مکانیکی جریان خون قرار دارد، بنابراین در پاسخ به آسیب کاهش جریان خون نقش مهمی بر عهده دارد. اندوتلیوم سینوزوئیدهای کبد با آزاد کردن ترکیبات گشادکننده عروق مثل NO hyperpolarizing factor و

پروستاگلاندین‌ها و نیز ترکیبات منقبض کننده عروق مثل ET-1 و ترومبوکسان A2 نقش مهمی در تنظیم پاسخ عروق به آسیب I/R ایفا می‌کند. گزارش شده است که بیان ژن‌های تنظیم کننده انقباض و انبساط عروق طی I/R تغییر می‌کند. به نظر می‌رسد تغییر در نیروی مکانیکی جریان خون روی اندوتلیوم عروق از طریق تحریک مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی، در نهایت منجر به تغییر بیان ژن‌های مرتبط با انقباض و انبساط عروق کبدی می‌گردد که مهم‌ترین پیامد این وقایع افزایش ET-1 و کاهش NO می‌باشد (۳۰، ۳۱، ۳۲). مهم‌ترین منقبض کننده عروق، ET-1 است که مطالعات زیادی حاکی از افزایش آن در طول I/R می‌باشد (۳۲). NO مشتق از آنزیم eNOS به عنوان متسع کننده قوی عروق مطرح است. به دنبال I/R سطح NO اندوتلیومی به سه دلیل کاهش می‌یابد که این سه دلیل شامل کاهش تولید از اندوتلیوم ناشی از کاهش اکسیژن و NADPH (دو سوسترای مورد نیاز برای ساخت NO) در کبد، واکنش NO با ROS تولید شده طی I/R و تولید رادیکال‌های نیتروژن (RNS) و آزاد شدن مقادیر زیاد آرژیناز بلافاصله پس از ریپرفیوژن که در آزمایشات گذشته اثبات شده است که باعث کاهش آرژینین در دسترس برای تولید NO می‌گردد، می‌باشد. تغییر تعادل NO/ET از طریق تنگ کردن عروق باعث کاهش جریان خون کبد طی ریپرفیوژن می‌شود که به ایسکمی دوم معروف می‌باشد (۳۳). در دیواره عروق، NO حاصل از عملکرد eNOS از غشای سلول‌های اندوتلیال عبور نموده، وارد سلول‌های هدف خود که مهم‌ترین آن سلول‌های ستاره‌ای است، می‌شود (۳۴). لازم به یادآوری است که مونواکسید کربن (CO) نیز با اتصال به گروه هم (Heme) موجود در گوانیل سیکلاز، فعالیت آن را تنها ۶ برابر افزایش می‌دهد که این نکته قدرت عملکرد NO را در این رابطه نشان می‌دهد (۳۵). علاوه بر اثرات فوق، مشخص شده است که cGMP القاء شده توسط NO به صورت منفی مولکول‌هایی نظیر گلیکوفورین II b/IIIa

1. Damage-associated molecular patterns

مطالعات زیادی نشان دادند، NO تولیدی از منابع التهابی صرف واکنش با ROS می شود و رادیکال های آزاد نیتروژنه (RNS) مثل پروکسی نتریت تولید می کند که باعث تشدید آسیب های استرس اکسیداتیو I/R می شود (۳۴). در همین راستا به کارگیری (L-N6(iminoethyl) lysine(L-NIL) به عنوان مهارکننده اختصاصی *iNOS* آسیب های I/R کبدی را تا حد زیادی کاهش داده است (۴۳). به نظر می رسد، به دلیل بالا بودن سطح ROS در سلول های التهابی (محل تولید *iNOS*) و افزایش سطح آن ها در بافت کبد در فاز تاخیری ریپرفیوژن به بیشینه خود، تعجب آور نخواهد بود که NO با ROS واکنش دهد و RNS تولید کند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن *iNOS* طی I/R افزایش یافت که احتمالاً علت اصلی آن فعال شدن سیستم ایمنی به خصوص نوتروفیل ها و سلول های کوپفر در فاز تاخیری (۲ ساعت پس از ریپرفیوژن) می باشد که در بررسی های میکروسکوپی مشاهده شده است. کاهش رونویسی ژن *iNOS* می تواند از عمق آسیب های I/R بکاهد. در مطالعه Park و همکاران، سطح mRNA ژن *iNOS*، با تزریق قبل از ایسکمی ملاتونین کاهش یافت (۴۴).

Ghobadi و همکاران نیز در مطالعه ی خود اثبات کردند که درمان با دگزامتازون قبل و پس از ایسکمی بیان ژن *iNOS* را به مقدار معنی داری کاهش می دهد (۴۵). نتایج بررسی های مطالعه حاضر نشان داد، سیلینین بیان ژن *iNOS* را به طور معنی داری طی I/R کاهش می دهد. به نظر می رسد که سیلینین با کاهش ROS، آسیب سلولی و فاکتورهای التهابی، باعث کاهش فعال سازی سلول های التهابی منبع تولید iNO می شود.

در نتیجه، سیلینین موجب کاهش آسیب های کلی بافت کبد طی I/R می شود و هم چنین سیلینین با کاهش بیان ژن *iNOS* می تواند از اثرات مضر آن بکاهد. با این حال پیشنهاد می گردد که اثر سیلینین روی مقدار

(برای تجمع و فعال شدن پلاکت ها و نوتروفیل ها ضروری هستند) را تنظیم می کند. در نتیجه NO باعث افزایش سیالیت خون و ریپرفیوژن موثر می شود (۳۶).

بررسی های این مطالعه نشان داد که بیان ژن *eNOS* طی I/R در کبد کاهش می یابد. در مطالعه KhonakdarTarsi و همکاران نشان داده شد که بیان ژن *eNOS* پس از ۶ ساعت ریپرفیوژن متعاقب ۹۰ دقیقه ایسکمی کبدی در رت، کاهش یافته است (۳۷). در مطالعه ای که توسط Napoli و همکاران انجام پذیرفت، اثبات شد که میزان mRNA ژن *eNOS* و همین طور پروتئین آن در قلب رت های دچار ۱۵ دقیقه ایسکمی و ۱۸۰-۲۲ دقیقه ریپرفیوژن نسبت به گروه شاهد کاهش چشمگیری داشته است (۳۸). به نظر می رسد که کاهش سطح بیان *eNOS* و مقدار NO و به دنبال آن انقباض سینوزوئیدها، به حفظ فشار خون در پاسخ به استرس کاهش جریان خون طی ایسکمی منجر می شود. هم چنین گزارش شده است که بیان *eNOS* با افزایش سطح ROS سرکوب می شود (۳۹). در مطالعات گذشته اثر ترکیبات مختلف روی بیان *eNOS* آزمایش شد. در مطالعه Ghanaat و همکاران، تزریق داروی ضد التهاب دگزامتازون قبل و پس از ایسکمی-ریپرفیوژن کبدی تغییر محسوسی در بیان ژن *eNOS* ایجاد نکرد (۴۰). Hung و همکاران اثبات کردند که درمان رت ها با آنتی اکسیدان گیاهی رزوراترول، باعث افزایش بیان *eNOS* در ایسکمی-ریپرفیوژن قلبی شده است (۴۱). در بررسی هایی که در مطالعه حاضر انجام گرفت، سیلینین نتوانست تاثیر معنی داری روی بیان ژن *eNOS* بگذارد. نیتریک اکسید سنتز القایی برای اولین بار در ماکروفاژهای فعال شناسایی گردید و تاکنون در سلول های دیگر نظیر مونوسیت ها، نوتروفیل ها، ائوزینوفیل ها، هیاتوسیت ها، پلاکت ها و اندوتلیوم نیز شناسایی شده است (۱). بیان ژن *iNOS* در صورت فعال شدن سیستم ایمنی (به عنوان مثال در پاسخ به لیپو پلی ساکارید، اینترفرون گاما، TNF- α و IL-1) القاء می شود (۴۲).

سپاسگزاری

این مطالعه با کد اخلاق ۳۴۰ و با پشتیبانی تجهیزاتی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی انجام شده است. علاوه بر این از کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران نیز که با حمایت‌های مالی خود در اجرای بخشی از این مطالعه سهم بوده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

پروتئین‌های *iNOS*، *eNOS* و هم‌چنین فعالیت این آنزیم‌ها طی I/R بررسی شود. با توجه به محدودیت‌های مالی و زمانی، انجام برخی از تکنیک‌های پیشرفته‌تر مثل وسترن بلات و ایمونوهیستوشیمی برای ما مقدور نبود. اما انجام این تکنیک‌ها جهت تایید یافته‌های این مقاله توصیه می‌شود.

References

- Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, Tasoulis M-K, Lykoudis PM, Theodoraki K, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 906965.
- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147(1): 153-159.
- Massip Salcedo M, RosellóCatafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007; 27(1): 6-16.
- Sonin NV, Garcia-Pagan J-C, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1999; 11(3): 175-179.
- Li J, Li R, Lv G, Liu H. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(11): 2036-2047.
- Hide Alférez D, Ortega Ribera M, García Pagán JC, Peralta Uroz C, Bosch i Genover J, Gracia-Sancho J. Effects of warm ischemia and reperfusion on the liver microcirculatory phenotype of rats: underlying mechanisms and pharmacological therapy. *Sci Rep* 2016; 6: 22107.
- Abd-Elbaset M, Arafa E-SA, El Sherbiny GA, Abdel-Bakky MS, Elgendy ANA. Quercetin modulates iNOS, eNOS and NOSTRIN expressions and attenuates oxidative stress in warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 2015; 4(3): 246-255.
- Sun Y, Pu L-Y, Lu L, Wang X-H, Zhang F, Rao J-H. N-acetylcysteine attenuates reactive-oxygen-species-mediated endoplasmic reticulum stress during liver ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2014; 20(41): 15289-15298.
- Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res* 2010; 24(10): 1423-1432.
- Prabu SM, Muthumani M. Silibinin ameliorates arsenic induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Mol Biol Rep* 2012; 39(12): 11201-11216.
- Wang C, Wang Z, Zhang X, Zhang X, Dong L, Xing Y, et al. Protection by silibinin against experimental ischemic stroke: up-regulated pAkt, pmTOR, HIF-1 α and Bcl-2, down-regulated Bax, NF- κ B expression. *Neurosci Lett* 2012; 529(1): 45-50.
- Tyagi A, Singh RP, Ramasamy K, Raina K, Redente EF, Dwyer-Nield LD, et al. Growth inhibition and regression of lung tumors by

- silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor- κ B and signal transducers and activators of transcription 3. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2(1): 74-83.
13. Adam ANI. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Gen Med* 2014; 7: 483-489.
 14. Canbek M, Uyanoglu M, Bayramoglu G, Senturk H, Erkasap N, Koken T, et al. Effects of carvedilol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine* 2008; 15(6-7): 447-452.
 15. Ergün Y, Kurutaş EB, Atalay F, Alici T. Effects of silibinin and ethanol on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Acta Cir Bras* 2013; 28(3): 179-184.
 16. Küçükdurmaz F, Efe E, Ergün Y, Kılıç M, Resim S. The effects of silibinin on corporal oxidative stress and antioxidant enzymes in ischemic priapism. *J Clin Anal Med* 2017; 8(suppl 4): 266-270.
 17. Clavien P-A, Selzner M, Rüdiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003; 238(6): 843-852.
 18. Han D, Hanawa N, Saberi B, Kaplowitz N. Mechanisms of liver injury. III. Role of glutathione redox status in liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291(1): G1-G7.
 19. Cederbaum AI. Introduction—serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury. *Free Radic Biol Med* 2001; 31(12): 1524-1526.
 20. Rovati LC, D'amato MM, Mengs U, Pohl R-T, Ferenci P. Silibinin component for the treatment of hepatitis. Google Patents; 2016.
 21. Zhou T, Prather ER, Garrison DE, Zuo L. Interplay between ROS and antioxidants during ischemia-reperfusion injuries in cardiac and skeletal muscle. *Int J Mol Sci* 2018; 19(2): 417.
 22. He Q, Kim J, Sharma RP. Silymarin protects against liver damage in BALB/c mice exposed to fumonisin B1 despite increasing accumulation of free sphingoid bases. *Toxicol Sci* 2004; 80(2): 335-342.
 23. Tiwari P, Mishra K. Silibinin in cancer therapy: A promising prospect. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2015; 1(3): 303-318.
 24. Miethe C, Nix H, Martin R, Hernandez A, Price R. Silibinin Reduces the Impact of Obesity on Invasive Liver Cancer. *Nutr Cancer* 2017; 69(8): 1272-1280.
 25. Demirci B, Cindoruk M, Yilmaz U, Demirag M, Gonul I, Demirci U, et al. Effects of everolimus on hepatic ischemia/reperfusion injury in an experimental rat model. *European Surgery* 2013; 45(3): 325-330.
 26. Yildiz F, Terzi A, Ates M, Aksoy N, Cakir H, Ocak AR, et al. Nigella sativa relieves the deleterious effects of ischemia reperfusion injury on liver. *World J Gastroenterol* 2008; 14(33): 5204-5209.
 27. AbuAmara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks—a review. *Liver Transpl* 2010; 16(9): 1016-1032.
 28. Giorgi VSI, Peracoli MT, Peracoli JC, Witkin SS, Bannwart-Castro CF. Silibinin modulates the NF- κ B pathway and pro-inflammatory cytokine production by mononuclear cells from preeclamptic women. *J Reprod Immunol* 2012; 95(1-2): 67-72.
 29. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, Esquivel-Soto J, Esquivel-Chirino C, y González-Rubio MG-

- L, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol* 2014; 6(3): 144.
30. Orr AW, Helmke BP, Blackman BR, Schwartz MA. Mechanisms of mechanotransduction. *Dev Cell* 2006; 10(1): 11-20.
31. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *World J Gastrointest Surg* 2001; 181(2): 160-166.
32. Garcia-Pagán J-C, Zhang JX, Sonin N, Nakanishi K, Clemens MG. Ischemia/reperfusion induces an increase in the hepatic portal vasoconstrictive response to endothelin-1. *Shock (Augusta, Ga)* 1999; 11(5): 325-329.
33. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, et al. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll like receptor 9 in mice. *Hepatology* 2011; 54(3): 999-1008.
34. Guan L-Y, Fu P-Y, Li P-D, Li Z-N, Liu H-Y, Xin M-G, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide. *World J Gastrointest Surg* 2014; 6(7): 122-128.
35. Potter LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal* 2011; 23(12): 1921-1926.
36. Mikaeili S, Kadkhodae M, Golab F, Zahmatkesh M, Mahdavi-Mazdeh M, Seifi B, et al. Effects of liver ischemia-reperfusion on renal functional and oxidative stress indices. *Physiol Pharmacol* 2009; 13(3):254-262 (Persian).
37. Tarsi AK, Ansari M, Khansari MG, Keramatipour M, Ebrahimi AE, Emamgholipour SE, et al. Melatonin inhibits endothelin-1 and induces endothelial nitric oxide synthase genes expression throughout hepatic ischemia/reperfusion in rats. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(58): 12222-12228.
38. Di Napoli P, Taccardi AA, Grilli A, De Lutiis MA, Barsotti A, Felaco M, et al. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovasc Res* 2005; 66(3): 462-471.
39. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352(16): 1685-1695.
40. Ghanaat K, Malekzadeh-Shafaroudi M, Khonakdar-Tarsi A. Effect of dexamethasone on the endothelin-1 (ET-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) genes expression during hepatic warm ischemia/reperfusion in rat. *Res Mol Med* 2016; 4(4): 8-14 (Persian).
41. Hung LM, Su MJ, Chen JK. Resveratrol protects myocardial ischemia-reperfusion injury through both NO-dependent and NO-independent mechanisms. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(6): 774-781.
42. Lee C-K, Choi J-S. Effects of silibinin, inhibitor of CYP3A4 and P-glycoprotein in vitro, on the pharmacokinetics of paclitaxel after oral and intravenous administration in rats. *Pharmacology* 2010; 85(6): 350-356.
43. Nie FQ, Sun M, Yang JS, Xie M, Xu TP, Xia R, et al. Long noncoding RNA ANRIL promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. *Mol Cancer Ther* 2015; 14(1): 268-277.
44. Park S-W, Choi S-M, Lee S-M. Effect of melatonin on altered expression of vasoregulatory genes during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res* 2007; 30(12): 1619-1624.
45. Ghobadi M, Ghanaat K, Valizadeh-Dizgikan A, Gohari G, Roadi B, Khonakdar-Tarsi A. The Effect of Dexamethasone on Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene During Liver Warm Ischemia-reperfusion in Rat. *Res Mol Med* 2015; 3(3): 17-22 (Persian).