

## کاهش ضایعات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد به وسیله L-Nil در کلیه موش صحرائی نر

مریم زحمتکش<sup>۱\*</sup>، مهری کدخدایی<sup>۱</sup>، حسینعلی عرب<sup>۲</sup> و علی احدی<sup>۱</sup>

۱- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

۲- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی

دریافت: مهر ۱۳۸۴ بازبینی: بهمن ۱۳۸۴ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۵

### چکیده

**مقدمه:** ضایعات ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد (IR) شامل مجموعه ای از وقایع متوالی و مرتبط به هم می باشند. تولید نیتریک اکساید (NO) ناشی از فرم القا پذیر آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (iNOS) نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی آسیب های ایسکمی - پرفیوژن مجدد در کلیه داراست. L-Nil، به عنوان یک مهار کننده انتخابی iNOS معرفی شده است و برای بررسی نقش iNOS در بسیاری از مطالعات استفاده شده است. در این مطالعه برآن شدیم تا اثر آن را در جلوگیری از ضایعات IR در کلیه بررسی کنیم.

**روش ها:** در این مطالعه برای القای ایسکمی، شریان هر دو کلیه به مدت ۴۰ دقیقه مسدود و سپس ۶h پرفیوژن مجدد برقرار شد. موش های صحرائی به طور تصادفی در چهار گروه Sham-operated، Sham+L-Nil، IR و IR+L-Nil قرار گرفتند. در گروه های IR، ۱۵ دقیقه قبل از زمان ایسکمی، L-Nil (mg/kg) ۳ IV و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg و یا سالین دریافت کردند. عملکرد کلیه با اندازه گیری BUN، کراتینین پلاسما، اسپاراتات آمینوترانسفراز، کسر دفع سدیم و فعالیت آنزیم ان-استیل بتا دی گلوکوزامینیداز ادرار ارزیابی شد.

**یافته ها:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که L-Nil، به طور معنی داری از افزایش شاخص های BUN، کراتینین پلاسما، اسپاراتات آمینوترانسفراز، کسر دفع سدیم و فعالیت آنزیم ان-استیل بتا دی گلوکوزامینیداز ادرار ناشی از ضایعات ایسکمی پرفیوژن مجدد جلوگیری می نماید.

**نتیجه گیری:** مهار تولید NO ناشی از iNOS می تواند ضایعات ناشی از IR را کاهش داده و سبب بهبود شاخص های عملکردی کلیه گردد. این نتایج همچنین بر این نکته تاکید داشت که ماهیت ضایعات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد در کلیه چند عاملی بوده و برای درمان چنین شرایط پیچیده ای باید به دنبال راهکارهای درمانی چند جانبه بود.

**واژه های کلیدی:** کلیه، ایسکمی - پرفیوژن مجدد، آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز، موش صحرائی نر، L-Nil.

### مقدمه

نیتریک اکساید سنتتاز (Inducible nitric oxide synthase, iNOS) در ضایعات ایسکمی - پرفیوژن مجدد در کلیه دخالت دارد [۳-۶]. نیتریک اکساید (NO) یک مولکول چند چهره می باشد که نقشهای متعددی در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی به عهده دارد. در شرایط پاتولوژیکی، بیان ژنی iNOS در سلولهای توبولی، سلول عضله صاف، سلول اپی تلیال و مزانژیال گومرولی افزایش می یابد [۳ و ۴]. یکی از عوامل مهم در پاتوفیزیولوژی نارسایی حاد کلیه، عدم تعادل بین بیان و فعالیت ایزوفرمهای iNOS و فرم اندوتلیال (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) می باشد. تولید NO ناشی از فعال شدن eNOS به صورت گذرا و موقتی است [۷]. این حالت برای فعال کردن گوانیلات سیکلاز، وازودیلاتاسیون و

ایسکمی - پرفیوژن مجدد (Ischemia-reperfusion; IR) یکی از دلایل آسیب بافتی در بسیاری از شرایط پاتولوژیکی می باشد. در ایسکمی، متابولیسم سلولی برای زنده نگهداشتن سلولها ناکافی است. در حالیکه پرفیوژن مجدد برای مبارزه با آسیبهای ناشی از ایسکمی ضروری است، خود با آسیبهای ثانویه ای همراه است. اگرچه جزئیات سلولی این آسیبها دقیقاً مشخص نیست اما شواهد زیادی وجود دارد که نیتریک اکساید (NO) تولید شده توسط فرم القا پذیر آنزیم

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:

zahmatm@yahoo.com

## روش اجرا

در این مطالعه از ۲۸ سر موش صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۳۰۰-۳۷۰ گرم با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد استفاده شد. همه گروهها توسط تزریق داخل صفاقی پنتوباریتال سدیم (۶۰ mg/kg) بیهوش شده و سپس با تزریق ۱۲ mg/kg/h پنتوباریتال سدیم، تا پایان آزمایش بیهوشی حفظ گردید. مدت زمان آزمایش در تمام گروهها یکسان بود. در تمام این مدت حیوان گرم نگهداشته شده و به منظور اطمینان از باز بودن راه هوایی و تسهیل تنفس تراکتوتومی انجام شد. سپس شریان فمور به منظور مانیتور کردن فشار شریانی کانول گذاری شد و فشار متوسط شریانی نیز طبق فرمول استاندارد (فشار دیاستولی + یک سوم فشار نبض) محاسبه گردید. ورید فمور به منظور تجویز دارو و انفوزیون مایعات و مثانه به منظور جمع آوری ادرار کانول گذاری گردید. سپس با یک برش عرضی روی شکم، Renal pedicles نمایان گردید و شریان هر دو کلیه از بافتهای اطراف به دقت جدا شد. برای به حداقل رساندن خونریزی از کوتر قلمی (FIAB, Italy) استفاده شد. پس از اتمام جراحی یک گاز آغشته به نرمال سالین جهت جلوگیری از خشک شدن احشا روی شکم قرار داده شد. در تمام گروهها بعد از اتمام اعمال جراحی به مدت ۶۰ دقیقه به حیوان فرصت داده شد تا حیوان در وضعیت پایداری قرار گیرد. سپس نمونه هایی که فشار متوسط شریانی بالاتر از ۹۵ میلیمتر جیوه داشتند، به طور تصادفی در یکی از ۴ گروه زیر قرار گرفتند:

۱- Sham-operated

۲- Sham+L- Nil

۳- IR

۴- IR+L- Nil

در گروه کنترل-جراحی یا Sham تمام مراحل جراحی فوق انجام گردید ولی شریانهای کلیه مسدود نشد. در تمام مدت آزمایش تحت بیهوشی بودند و یک تزریق بولوس سالین (vehicle) و انفوزیون سالین به میزان ۶ ml/kg/h دریافت کردند. در گروه Sham+L- Nil تمام شرایط مانند گروه Sham بود با این تفاوت که به جای سالین یک تزریق بولوس L- Nil (۳ mg/kg/IV) و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg/h دریافت کردند. در گروه کنترل IR، ۱۵ دقیقه قبل از القای ایسکمی یک بولوس سالین دریافت کردند و سپس توسط کلمپ بولداگ به مدت ۴۰ دقیقه هر دو شریان کلیوی راست و چپ مسدود شد و از تغییر رنگ کلیه به منظور تایید انسداد استفاده شد. سپس با باز کردن کلمپ مدت ۶ ساعت پرفیوژن مجدد برقرار شد و در این مدت انفوزیون سالین به میزان ۶ ml/kg/h دریافت کردند. در گروه IR+L- Nil تمام شرایط مانند گروه IR بود با این تفاوت که ۱۵ دقیقه قبل از القای ایسکمی یک بولوس L- Nil (۳ mg/kg/IV) و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg/h دریافت کردند. در تمام گروهها در دقیقه ۵۵ (۵۱ دقیقه قبل از ایسکمی + ۴۰ دقیقه زمان ایسکمی)، یک نمونه خون (۰/۳ میلی لیتر) از مسیر شریانی به منظور اندازه گیری مقدار کراتینین پایه گرفته شد. در مدت زمان

حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو و روندهای آنتی آپتوز حیاتی است. اما تولید NO توسط iNOS به مدت طولانی (چند ساعت تا چند روز) ادامه می یابد [۸]. تولید زیاد و طولانی NO توسط iNOS با توجه به شرایط سلول ممکن است طیف وسیعی از اعمال آنتی آپتوز تا پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب DNA و اثرات پروآپتوتیک را فعال نماید [۹]. شوارتز و همکارانش در سال ۱۹۹۷ پیشنهاد کردند که القای iNOS سبب مهار eNOS می شود و این مهار سبب انقباض عروق کلیه می گردد. فعالیت طبیعی eNOS نقش حیاتی در محدود کردن اثرات منقبض کننده آنژیوتانسین II و کاتکول آمینها در کلیه دارد [۱۰]. در واقع عدم تعادل بین سیستم های منقبض کننده و گشادکننده عروقی ایجاد می شود [۱۱]. شواهدی نیز وجود دارد که NO از دو طریق آنتاگونیست کردن اثر آنژیوتانسین II بر باز جذب سدیم در توبول پروگزیمال [۱۲] و مهار مستقیم پمپ سدیم-پتاسیم [۱۳] اثر ناتریورز اعمال می کند. علاوه بر آن تماس طولانی به NO منجر به مهار کمپلکس I زنجیره تنفسی شده و در نتیجه منجر به کاهش غلظت سلولی گلوتاتیون (Glutathione, GSH) می شود [۱۴]. تری پپتید ال-گاما گلوتامیل-ال-سیستئین-گلیسین یا GSH ترکیب عمده تیول در گیاهان، میکروارگانیسم ها و همه بافتهای پستانداران است. تقریباً ۹۰٪ GSH سلول در سیتوسول، ۱۰٪ در میتوکندری قرار دارد و فاکتوری اساسی در حفظ تعادل اکسیداسیون-احیای سلول می باشد [۱۵]. NO با از دست دادن یک الکترون، کاتیون بسیار فعال نیتروزیل را ایجاد می کند. علاوه واکنش NO و آنیون سوپراکسید (که بطور عمده از زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری نشأت می کند)، پراکسی نیتريت را تولید می نماید. کاتیون نیتروزیل و پراکسی نیتريت هر دو GSH را اکسید می کنند [۱۶ و ۱۷]. سوالی که مطرح می باشد این است که آیا مهار انتخابی iNOS و تولید NO ناشی از آن می تواند از کاهش سطح GSH بافت کلیه جلوگیری نموده و مانع ایجاد ضایعات ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد گردد. با توجه به این امر که تاکنون در مدل *in vivo* ارائه شده (انسداد دو طرفه شریانهای کلیه به مدت ۴۰ دقیقه و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد) این اثر بررسی نشده است، در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر ال-ایمینواتیل لیزین هیدروکلراید (L- Nil) را که یک مهار کننده انتخابی iNOS می باشد، در این مدل بررسی کنیم و به این منظور، شاخص های متعدد عملکردی کلیه و سطح GSH آن اندازه گیری شد.

## مواد و روشها

ال-ایمینواتیل لیزین هیدروکلراید از شرکت سیگما خریداری شد. پنتوباریتال سدیم و DTNB (5,5'-Dithio bis 2-Nitrobenzoic acid) و P-نیتررو فنیل بتا دی گلوکوزامینیداز از شرکت Sigma-Aldrich و محلول Griess از شرکت Alexis خریداری شد.

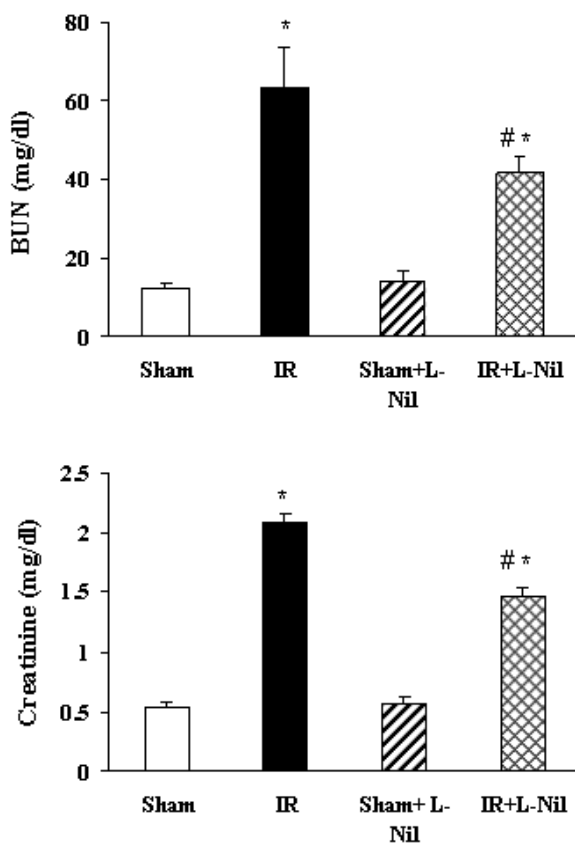
توسط نیتريت اسیدی و سپس ترکیب آن با آمینهای دولحله‌ای یک ماده رنگی تشکیل می‌شود که می‌توان جذب آن را در ۵۴۰ نانومتر خواند.

### روش اندازه گیری گلوکاتینون

گلوکاتینون با استفاده از روش آنزیمی Tietze و اصلاحات Griffith اندازه گیری شد [۲۱]. در این روش گلوکاتینون پی در پی توسط DTNB (۵' دی تیو بیس-۲-نیتروبنزوئیک اسید) اکسید شده و در حضور گلوکاتینون ردوکتاز توسط NADPH احیا می‌شود. میزان یا سرعت تشکیل ۲-نیترو-۵ تیوبنزوئیک اسید در طول موج ۴۱۲ نانومتر مانیتور شده و مقدار گلوکاتینون از مقایسه نتایج با منحنی استاندارد بدست آمد.

### روش آماری

در این تحقیق نتایج بر اساس برنامه آماری SPSS-10 و تست آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه چندگانه از شاخص توکی استفاده شد. اختلاف معنی دار در سطح  $P \leq 0.05$  در نظر گرفته شد. تعداد نمونه‌ها در هر گروه هفت می‌باشد.



شکل ۱- تغییرات غلظت BUN و کراتینین پلاسما در گروه‌های مختلف هر یک از ستونها نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای معیار BUN و کراتینین بر حسب میلی گرم در دسی لیتر می‌باشد. گروه‌های Sham+L- Nil و IR + L- Nil، یک تزریق بولوس L- Nil به میزان ۳ mg/kg و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg/h دریافت کردند. \*، اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه Sham در سطح  $p < 0.05$  نشان می‌دهد. # اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه IR در سطح  $p < 0.05$  نشان می‌دهد. (n=7 در هر گروه)

پرفیوژن مجدد در تمام گروهها ادرار جمع آوری شد و در انتها یک نمونه خون از مسیر شریانی به منظور اندازه گیری شاخص های عملکردی کلیه و آسیب های ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد گرفته شد. کراتینین پلاسما (Cr) و (Blood Urea Nitrogen) BUN به عنوان شاخص های آسیب عملکرد گومرولی با روش اسپکتروفتومتری (آنالیز هیتاچی ۷۰۴) به ترتیب در طول موج ۵۰۵ و ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) که در سلولهای توبول پروگزیمال وجود دارد به عنوان شاخص آسیب ناشی از پرفیوژن مجدد به کار رفت که با روش کینتیک اندازه گیری شد. از آنجایی که از نظر بالینی و پاتوفیزیولوژی تغییرات مقدار کراتینین (نه مقدار مطلق آن) در تشخیص نارسایی حاد کلیوی اهمیت دارد لذا  $\Delta Cr$  (مقدار کراتینین در انتهای آزمایش منهای مقدار کراتینین پایه) نیز محاسبه گردید. علاوه بر این غلظت پلاسمایی و ادراری سدیم به منظور محاسبه کسر دفع سدیم ( $FE_{Na+}$ ) به کار رفت که شاخصی با ارزش در ارزیابی اختلال در عملکرد و نکروز توبولها است. فعالیت ادراری آن - استیل بتا دی گلوکوزامینیداز (NAG) نیز به عنوان شاخص آسیبهای توبولی اندازه گیری شد.

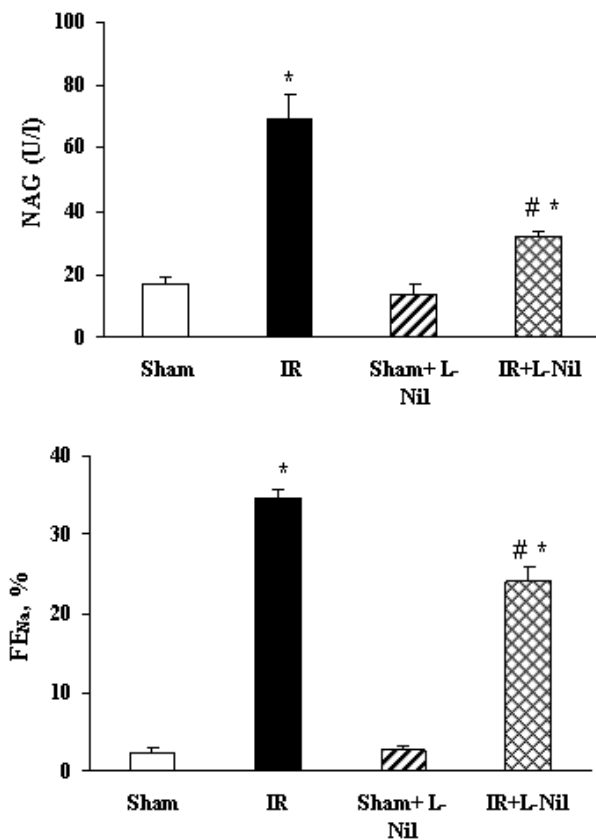
در مطالعاتی که مسیر تولید NO مطرح می‌باشد و یا از مهارکننده های NOS استفاده می‌شود، می‌توان غلظت نیترات و نیتريت پلاسما را به عنوان شاخصی از تولید NO در نظر گرفت. در این مطالعه نیز سطح نیترات و نیتريت پلاسما با استفاده از روش واکنش Griess اندازه گیری شد. در انتهای آزمایش بلافاصله بعد از خونگیری، بافت کلیه برای اندازه گیری GSH خارج شد. نکات اخلاقی در خصوص کار با حیوان آزمایشگاهی طبق پروتکل دانشگاه علوم پزشکی تهران رعایت گردید.

### روش اندازه گیری آن - استیل بتا دی گلوکوزامینیداز (NAG)

آن - استیل بتا دی گلوکوزامینیداز یک گلیکوزیداز لیزوزومی است که به میزان فراوان در توبول پروگزیمال وجود دارد. فعالیت ادراری آن شاخص بسیار حساس از آسیبهای توبولی است. در این مطالعه تمامی نمونه های ادرار در فریزر ۲۰- نگهداری شد. فعالیت NAG با استفاده از هیدرولیز آنزیمی P- نیترو فیل بتا دی گلوکوزامینیداز و سنجش اسپکتروفتومتری یون p-nitrophenylate در طول موج ۴۰۲ نانومتر اندازه گیری شد [۱۸].

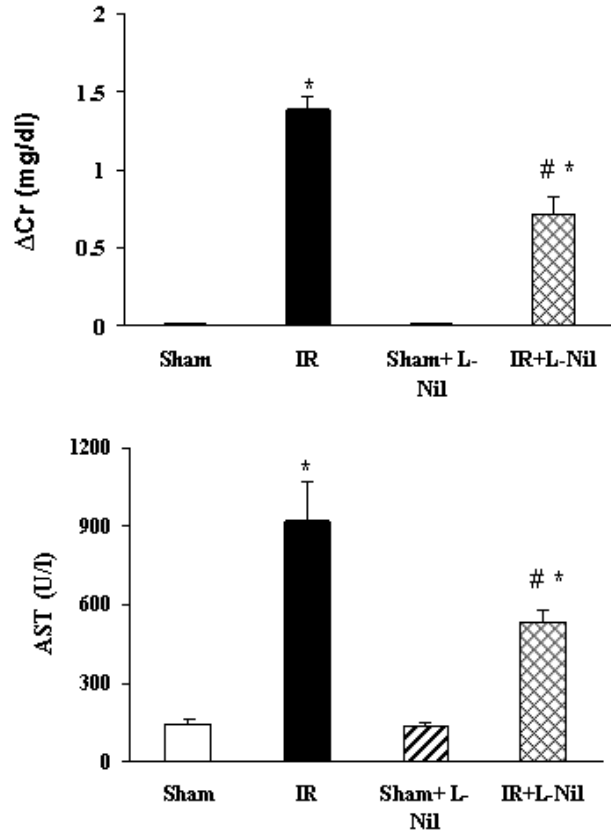
### روش اندازه گیری سطح نیتريت و نیترات پلاسما (NOx)

رابطه بین تولید NO اندوژن و سطح نیتريت و نیترات پلاسما (NOx)، سرم و ادرار به خوبی مشخص شده است [۱۹]. بنابراین اندازه گیری این متابولیتها، تخمین قابل قبولی از تولید NO می‌باشد. در این مطالعه سطح نیتريت و نیترات پلاسما با روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد [۲۰]. اساس این روش، احیای نیترات توسط وانادیوم کلراید و بررسی واکنش اسیدی Griess می‌باشد. واکنش Griess اولین بار در سال ۱۸۷۹ شرح داده شد. در این واکنش از دی‌ازته شدن سولفانیلامید



شکل ۳- تغییرات NAG و  $FE_{Na^+}$  در گروه های مختلف

هر یک از ستونها نمایانگر میانگین  $\pm$  SEM می باشد. گروه های Sham+L- Nil و IR+L- Nil، یک تزریق بولوس L- Nil به میزان 3 mg/kg و انفوزیون آن را به میزان 1 mg/kg/h دریافت کردند. \* اختلاف معنی دار را نسبت به گروه Sham در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. # اختلاف معنی دار را نسبت به گروه IR در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. (n=7 در هر گروه)



شکل ۴- تغییرات غلظت ΔCr و AST در گروه های مختلف

هر یک از ستونها نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای معیار AST برحسب واحد در لیتر و ΔCr بر حسب میلی گرم در دسی لیتر می باشد. گروه های Sham+L- Nil و IR+L- Nil، یک تزریق بولوس L- Nil به میزان 3 mg/kg و انفوزیون آن را به میزان 1 mg/kg/h دریافت کردند. \* اختلاف معنی دار را نسبت به گروه Sham در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. # اختلاف معنی دار را نسبت به گروه IR در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. (n=7 در هر گروه)

## یافته ها

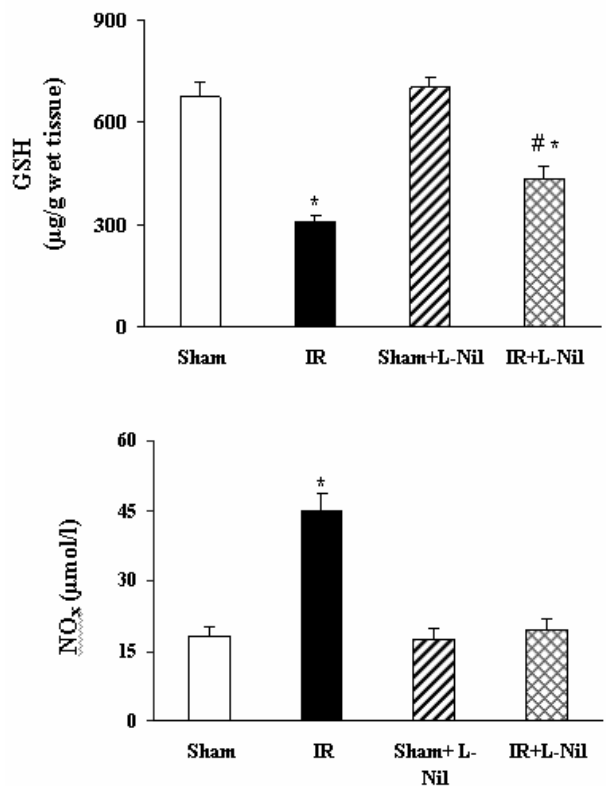
شکل ۲ نشان دهنده تغییرات اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و ΔCr (مقدار کراتینین در انتهای آزمایش منهای مقدار کراتینین پایه) در گروه های مختلف می باشد. میزان AST  $149/5 \pm$  (پایه) در برابر  $921/7 \pm$  (در برابر  $9/78 \pm$ ) و ΔCr  $1/39 \pm$  (در برابر  $0/078 \pm$ ) در گروه IR به طور معنی داری بیشتر از گروه Sham می باشد و تجویز L- Nil، مقدار AST  $(135 \pm 64)$  و ΔCr  $(0/71 \pm 0/11)$  را نسبت به گروه IR کاهش داد.

ان- استیل بتا دی گلوکوزامینداز (NAG) یک گلیکوزیداز لیزوزومی است که به میزان فراوان در توبول پروگزیمال وجود دارد و فعالیت ادراری آن شاخص بسیار حساس آسیبهای توبولی است. 40 دقیقه ایسکمی و 6 ساعت پرفیوژن مجدد در گروه IR، به طور معنی داری، سبب افزایش فعالیت این آنزیم گردید ( $16/92 \pm 2/25, U/l$ ) در برابر  $72/18 \pm 10/6$ ، همچنین در گروه IR،  $FE_{Na^+}$   $2/28 \pm 0/4$ ٪ در برابر  $1/08 \pm 34/7$ ٪ نسبت به گروه Sham بطور معنی داری افزایش یافت. تجویز L- Nil مقدار NAG  $(31/93 \pm 1/99)$  و  $FE_{Na^+}$

در تمامی گروهها مقدار فشار متوسط شریانی در زمان آزمایش با مقدار پایه (به ترتیب  $10/3 \pm 10/9$  و  $9/8 \pm 110$  میلیمتر جیوه) تفاوت معنی داری نداشت. علاوه بر آن تجویز L- Nil با دوز  $(3 \text{ mg/kg/IV})$ ، اثری بر میزان فشار متوسط شریانی و تعداد ضربان قلب نداشت. چهل دقیقه ایسکمی و 6 ساعت پرفیوژن مجدد به طور معنی داری BUN  $(63/5 \pm 0/1/4)$  در برابر  $12/28 \pm 1/35$  میلی گرم در دسی لیتر) و کراتینین  $(2/09 \pm 0/06)$  در برابر  $0/54 \pm 0/04$  میلی گرم در دسی لیتر) را در مقایسه با گروه کنترل-جراحی یا Sham افزایش داد که نشاندهنده اختلال قابل توجه در عملکرد گلومرولها می باشد. تجویز L- Nil به طور معنی داری مانع افزایش BUN  $(4/185 \pm 3/91)$  و کراتینین  $(1/46 \pm 0/07)$  نسبت به گروه IR شد که همانطور که در شکل ۱ نیز نشان داده شده است، اوره و کراتینین به ترتیب 34٪ و 30٪ در مقایسه با نتایج گروه IR کاهش یافت.

در مورد مهار NOS نتایج متناقضی به همراه داشته است. در حالیکه مهار NOS در *invitro* حفاظت کننده بوده است، همان مهار کننده در شرایط *in vivo* نارسایی حاد کلیه را بدتر کرده است [۲۲ و ۲۳]. یکی از دلایل این تناقض این است که مهار کننده‌های موجود NOS کاملاً انتخابی و اختصاصی نیستند. انواع مختلف NOS بطور متفاوت بر سلول اثر دارند [۲۳]. بنابراین اگر منابع متفاوت NO اثرات متفاوتی اعمال کنند، استفاده از یک مهار کننده غیرانتخابی ممکن است نتایج مبهمی ایجاد کند. L-Nil به عنوان مهار کننده انتخابی iNOS مطرح می‌باشد. مکانیسم دقیق شیمیایی و مولکولی مهار آن شناخته شده نیست اما به صورت رقابتی با ال-آرژینین عمل کرده و روند غیرفعال شدن وابسته به زمان را نشان می‌دهد. از واکنش آن ترکیبی حاصل می‌شود که به شدت فعال بوده و اغلب یک رادیکال آزاد است. این ترکیب با حمله به محل فعال آنزیم و اتصال کووالان به آن سبب غیرفعال شدن برگشت ناپذیر آنزیم می‌گردد [۲۴].

در این مطالعه ۴۰ دقیقه ایسکمی و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد به طور مشخص سبب آسیب کلیه گردید که با افزایش BUN و کراتینین مشخص شد. از آنجایی که از نظر بالینی و پاتوفیزیولوژی تغییرات مقدار کراتینین در تشخیص نارسایی حاد کلیوی اهمیت دارد لذا  $\Delta Cr$  (مقدار کراتینین در انتهای آزمایش منهای مقدار کراتینین پایه) نیز محاسبه گردید که در گروه IR به طور معنی داری افزایش یافت. غلظت پلاسمایی AST که در توبول های پروگزیمال وجود دارد، به عنوان شاخصی از آسیبهای سلولی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد در نظر گرفته شد که در گروه IR به طور معنی داری افزایش یافت. تجویز L-Nil مانع افزایش BUN، Cr،  $\Delta Cr$  و AST گردید که نشان دهنده کاهش آسیبهای ناشی از IR می‌باشد. علاوه بر آن در گروه IR مقدار NAG و  $FE_{Na+}$  نیز به طور معنی داری افزایش یافت که نشان دهنده آسیب به توبولها می‌باشد. تجویز L-Nil به طور معنی داری از افزایش شاخص های فوق به واسطه ایسکمی-پرفیوژن مجدد جلوگیری نمود که کاهش ضایعات سلولی و کاهش آسیب به توبولها را نشان می‌دهد. اثرات مفید این دوز (۳ mg/kg) در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است در حالیکه دوزهای بالاتر (۱۰ mg/kg) یا پایین تر (۱ mg/kg) آن اثرات حفاظتی نشان نداده‌اند [۵۲]. این نقش دوگانه نشان می‌دهد که مهار انتخابی iNOS توسط L-Nil در دوزهای بالاتر کاهش می‌یابد. در واقع دوز ۳ mg/kg فعالیت iNOS را مهار می‌کند اما فعالیت eNOS طبیعی باقی می‌ماند. در حالیکه دوزهای بالاتر احتمالاً بر فعالیت eNOS نیز اثر می‌گذارند [۱۱ و ۲۵]. بخشی از اثرات مفید L-Nil احتمالاً به علت بهبود عدم تعادل بین گشادکننده های عروقی و عوامل منقبض کننده عروقی است، علاوه بر اینکه تشکیل پراکسی نیتريت را کاهش می‌دهد. در سال ۲۰۰۱، Noiri و همکارانش به مدت ۴۵ دقیقه شریان کلیه چپ موش صحرایی نر را مسدود نموده و بعد از انجام نفرکتومی راست، کلمپ شریان کلیه چپ را برداشتند. آنها نیز از L-Nil استفاده نمودند و ۲۴ ساعت بعد شاخصهای عملکردی و بافتی کلیه را مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه



شکل ۴- تغییرات GSH و NOx در گروه های مختلف

هر یک از ستونها نمایانگر میانگین  $\pm$  SEM می باشد. گروه های Sham+L-Nil و IR + L-Nil، یک تزریق بولوس L-Nil به میزان ۳ mg/kg و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg/h دریافت کردند. \* اختلاف معنی دار را نسبت به گروه Sham در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. # اختلاف معنی دار را نسبت به گروه IR در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. (n=7 در هر گروه)

( $1/74 \pm 24/07\%$ ) را نسبت به گروه IR به ترتیب ۳۵٪ و ۳۰٪ کاهش داد. (شکل ۳).

شکل ۴ نشان دهنده تغییرات گلوکوتایون (GSH) و سطح نیتريت و نیتريت پلاسم (NOx) در گروه های مختلف می باشد. ایسکمی سبب کاهش معنی دار GSH در مقایسه با گروه Sham شد ( $420/7 \pm 15/7$  در برابر  $305/3 \pm 20/18$ ). تجویز L-Nil ( $420/7 \pm 25/9$ ) افزایش معنی داری را در میزان GSH توتال بافت کلیه در مقایسه با نتایج گروه IR ایجاد کرد. ایسکمی کلیه همچنین سبب افزایش معنی دار NOx در مقایسه با گروه Sham شد ( $44/86 \pm 4/04$ ،  $\mu\text{mol/l}$ ) در برابر  $18/27 \pm 2/01$ ) و تزریق L-Nil، میزان NOx را بطور معنی داری در مقایسه با گروه IR ( $19/4 \pm 2/36$ ) کاهش داد.

## بحث

مکانیسمی که به واسطه آن القای iNOS در شرایط استرس اکسیداتیو صورت می‌گیرد، به خوبی شناخته نشده است. نکته جالب توجه این است که نتایج آزمایشات انجام شده در شرایط *invitro* و *in vivo*

باشد اما عوامل متعددی در پاتوژنز ضایعات IR در کلیه دخالت دارند. بنابراین برای درمان چنین شرایط پیچیده ای باید به دنبال راهکارهای چند جانبه بود و این امر تنها با فهم بهتر نقش مسیرهای مختلف درگیر در ضایعات IR میسر خواهد شد.

### منابع

- [1] Thadhani R, Pascual M, Bonventre J, Acute renal failure. *New Engl J Med* 334 (1996) 448-1460.
- [2] Weight SC, Renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 83 (1996) 162-170.
- [3] Romagnani P, Pupilli C, Lasagni L, Baccari MC, Bellini F, Amorosi A, Bertoni E, Serio M, Inducible nitric oxide synthase expression in vascular and glomerular structures of human chronic allograft nephropathy. *J Pathol* 187 (1999) 345-350.
- [4] Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS, In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J Clin Invest* 97 (1996) 2377-2383.
- [5] Ling H, Gengaro PE, Edelstein CL, Martin PY, Wangsiripaisan A, Nemenoff R, Schrier RW, Effect of hypoxia on proximal tubules isolated from nitric oxide synthase knockout mice. *Kid Int* 53 (1998) 1642-1646.
- [6] Ling H, Edelstein C, Gengaro P, Meng X, Lucia S, Knotek M, Wangsiripaisan A, Shi Y, Schrier R, Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible NO synthase knockout mice. *Am J Physiol* 277 (1999) F383-F390.
- [7] Tsukahaea H, Gordienko D, Goligoesky MS, Continuous monitoring of NO release by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commu* 193722 (1993) (-729).
- [8] Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E, Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kid Int* 61 (2002) 855-861.
- [9] Davis K, Martin E, Tueko I, Muead F, Novel effects of NO. *Annu Rev Pharmacol Tox* 41 (2001) 203-236.
- [10] Schwaetz D, Blum M, Peer G, Wollman Y, Maree A, Serban I, Grosskopf I, Cabili S, Levo Y, Iaina A, Role of nitric oxide (EDRF) in radiocontrast acute renal

آنها تجویز L-Nil سبب بهبود عملکرد کلیه گردید و آسیبهای اکسیداتیو را کاهش داد. آنها دلیل این اثر را مهار تشکیل پراکسی نیتريت گزارش نمودند [۲۶].

مقدار زیاد NO می تواند منجر به تخلیه ATP سلولی و آسیب در غشای پلاسمایی شود. NO می تواند آنزیم های حاوی سولفور آهن مثل اکونیتاز و آنزیم های دخیل در انتقال الکترون در میتوکندری را غیر فعال نماید. NO می تواند با تخلیه ATP به یکپارچگی اسکلت سلولی آسیب برساند [۲۲]. بنابراین مهار تولید زیاد NO ناشی از القای iNOS توسط L-Nil با جلوگیری از ضایعات به اسکلت سلولی اکتین می تواند سبب بهبود عملکرد سلولهای توبولی و در نتیجه کاهش کسر دفع سدیم گردد. شواهدی وجود دارد که NO از دو طریق آنتاگونیزه کردن اثر آنژیوتانسین II بر بازجذب سدیم در توبول پروگزیمال [۱۲] و مهار مستقیم پمپ سدیم-پتاسیم [۱۳] اثر ناتریورز اعمال می کند. بنابراین بخشی از اثرات مطلوب استفاده از L-Nil در کاهش کسر دفع سدیم ممکن است به دلیل حذف اثرات ناتریورز NO باشد.

تولید گونه های فعال نیتروژن مانند پراکسی نیتريت توسط NO، کاهش GSH در شرایط IR را توجیه می نماید. بنابراین به نظر می رسد که در مطالعه کنونی مهار iNOS توسط L-Nil با کاهش تشکیل این گونه های فعال از اکسیداسیون GSH جلوگیری نموده و GSH داخل سلولی را حفظ نموده است. این مقدار البته همچنان با گروه Sham اختلاف معنی دار دارد. این نتایج موافق با مطالعه Zhang و همکارانش در سال ۲۰۰۰ می باشد که اثر L-Nil را در استرس اکسیداتیو در کبد مورد بررسی قرار دادند. در مطالعه آنها نیز مهار iNOS توسط L-Nil به حفظ GSH سلول کمک کرده و پراکسیداسیون لیپیدها را کاهش داد [۲۸].

عوامل مختلفی در پاتوژنز ضایعات ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد دخالت دارند. این احتمال وجود دارد که مهار مسیر تولید NO ناشی از القای iNOS اثرات مسیرهای دیگر را نیز تحت تاثیر قرار دهد. Kurata و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در رتھایی که نفرکتومی راست شده بودند، شریان کلیه چپ را به مدت ۴۵ دقیقه مسدود نمودند و ۵ دقیقه قبل از القای ایسکمی، از یک دهنده NO و یک مهار کننده غیر انتخابی NOS استفاده نمودند. آنها نشان دادند که مهار غیر انتخابی NOS به صورت وابسته به دوز علاوه بر تشدید آسیبهای کلیه سبب افزایش بیشتر اندوتلین می شود. این نتایج نشان داد که NO اثر مهار کننده بر تولید بیش از حد اندوتلین در کلیه ی پس از ایسکمی دارد [۲۹]. حال این سوال مطرح می شود که آیا چنین اثری با مهار انتخابی iNOS نیز در کلیه ایسکمیک ایجاد می شود؟ در این زمینه نتایج متفاوتی در مدل ها و ارگان های مختلف وجود دارد [۳۰]. در مطالعه کنونی، مهار iNOS توسط L-Nil سبب بهبود عملکرد کلیه شد که با کاهش سطح BUN، کراتینین، AST،  $FE_{Na+}$ ، NAG مشخص شد اما مقدار شاخص ها به سطح کنترل نرسید. این امر نشان می دهد که القای iNOS مسؤل بخش قابل توجهی از ضایعات ناشی از IR می

- nitric oxide in renal hemodynamic abnormalities of cyclosporine nephrotoxicity. *Kid Int* 46 (1994) 773-779.
- [23] Huang Z, Huang P, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA, Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal NOS. *Science* 265 (1994) 1883-1885.
- [24] Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357 (2001) 593-615.
- [25] Walker LM, Walker PD, Imam SZ, Mayeux PR: Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury, studies with the inducible NO synthase inhibitor L-N-(1-Iminoethyl)-lysine. *J Pharmacol Exp Ther* 295 (2000) 417-422.
- [26] Noiri E, Nakao A, Uchida K, Tsukahara H, Ohno M, Fujita T, Brodsky S, Goligorsky MS: Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol* 281 (2001) F948-F957.
- [27] Nath KA, Norby SM, Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 109 (2000) 655-678.
- [28] Zhang C, Walker LM, Hinson JA, Mayeux PR, Oxidant Stress in Rat Liver after Lipopolysaccharide Administration: Effect of Inducible Nitric-Oxide Synthase Inhibition. *J Pharmacol & Exp Therap* 293 (2000) 968-972.
- [29] Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, Katayama T, Nitric Oxide Protects against Ischemic Acute Renal Failure through the Suppression of Renal Endothelin-1 Overproduction. *J Cardiovas Pharm* 44 (2004) S455-S458.
- [30] Asakura H, Asamura R, Ontachi Y, Hayashi T, Yamazaki M, Selective inducible nitric oxide synthase inhibition attenuates organ dysfunction and elevated endothelin levels in LPS-induced DIC model rats. *J Thromb & Haemos* 3 (2005) 1050-1055.
- failure in rats. *Am J Physiol* 267 (1994) F374-F379.
- [11] Gabbai FB, Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. *Nephrol Dia Trans* 16 (2001) 10-13.
- [12] Ito S, Nitric oxide in the kidney. *Curr Opin in Nephrol Hypert* 4 (1995) 23-30.
- [13] Guzman NJ, Fang MZ, Tang SS, Ingelfinger JR, Garg LC, Autocrine inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest* 95 (1995) 2083-2088.
- [14] Clementi E, Brown JC, Feelisch M, Moncada S, Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Nat Acad Sci* 95 (1998) 7631-7636.
- [15] Sies H, Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radi Bio & Med* 27 (1999) 916-921.
- [16] Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J, Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms *Science* 258 (1992) 1898-902.
- [17] Stamler JS, Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 23 (1994) 931-6.
- [18] Horak E, Hopfer SM, Sunderman FW, Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-B-D-glucosaminidase activity. *Clin Chem* 27 (1981) 1180-1185.
- [19] Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB, Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Meth in Enzy* 268 (1996) 142-151.
- [20] Miranda KM, Espey MG, Wink DA, A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide* 5 (2001) 62-71.
- [21] Griffith OW, Determination of Glutathione and Glutathione disulfide using Glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106 (1980) 207-212.
- [22] Bobadilla NA, Tapia E, Feanco M, Lopez P, Mendoza S, Garcia TR, Alvarado JA, Herrera AJ, Role of