

# ارزیابی اثر نیتریک اکساید درون‌زا بر میزان اخذ آب در رت‌های

## کلستاتیک: مطالعه تجربی

بی‌تا وزیر<sup>۱</sup>، وهاب باباپور<sup>۱\*</sup>، احمدرضا دهپور<sup>۲</sup>، علی باغبان‌زاده<sup>۱</sup>

### Evaluation of Endogenous Nitric Oxide Effect on Water Intake in Cholestatic Rats: An experimental study

Vazir, B.<sup>1</sup>, Babapour, V.<sup>1\*</sup>, Dehpour, A.<sup>2</sup>, Baghbanzadeh, A.<sup>1</sup>

<sup>1\*</sup> - Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. (e-mail: bpvahab@gmail.com)

<sup>2</sup> - Department of Basic Sciences, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran-Iran.

Cholestasis stops the flow of bile from the liver to the duodenum. Cholestasis is associated with the over production of endogenous nitric oxide (NO), and water intake disturbances are commonly encountered in these patients. The purpose of this study was to determine whether elevation of endogenous NO effects on water intake alterations in cholestatic patients.

42 mature male rats were randomly divided into 7 groups (N=6) one control group (C), three sham B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>), and three experimental groups A (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>). After preparation and anesthesia, double ligations were placed on common bile duct in experimental groups, and a loose ligation was done on common bile duct in sham groups. In subgroups A<sub>1</sub> and B<sub>1</sub>, Aminoguanidine (100 mg/kg, IP, for 21 days), in subgroups A<sub>2</sub> and B<sub>2</sub>, N-nitro-L arginine methyl ester (L-Name) (10 mg/kg, IP, for 21 days) and in subgroups A<sub>3</sub> and B<sub>3</sub> and group C, normal saline 0.9% (the same volume, IP, for 21 days) was administrated. Water intake volume in all groups were detected daily. Data was analysed by Tukey's test and ANOVA. Statistical analysis showed that water intake increased in subgroup A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> (p<0.001), but water intake decreased in subgroup A<sub>3</sub>.

Results showed that increase endogenous NO may have an important role on decrease of in water intake in cholestatic rats.

**Keywords:** Cholestasis, Water intake, Nitric oxide, Rat

### چکیده

کلستاز به انسداد جریان صفرا از مجرای صفراوی کبد به داخل دئودنوم اطلاق می‌شود. از آنجایی که در بیماران کلستاتیک کاهش تمایل به نوشیدن آب کاملاً جلب توجه می‌کند و این مسئله در روند بهبودی این بیماران اختلالاتی را به وجود می‌آورد، و از طرف دیگر در این بیماران نیتریک اکساید (NO) درون‌زا افزایش می‌یابد. مطالعه حاضر جهت بررسی احتمال تاثیر افزایش نیتریک اکساید درون‌زا بر کاهش اشتها به آب با بهره‌گیری از الگوی تجربی ایجاد کلستاز در رت انجام گردید.

به منظور مطالعه تجربی حاضر ۴۲ سر رت نر بالغ به طور تصادفی به ۷ گروه ۶ تایی شامل ۳ گروه آزمایش، ۳ گروه Sham و یک گروه شاهد تقسیم شدند. رت‌های گروه‌های آزمایش طبق الگوی لیگاتور دوپل کلستاتیک شدند و در رت‌های گروه‌های Sham فقط بر روی مجرای صفراوی یک لیگاتور شل قرار داده شد. اولین گروه آزمایش و گروه Sham مربوطه روزانه به مدت ۲۱ روز آمینوگوانیدین (مهارکننده نیتریک اکساید) به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی، گروه دوم آزمایش و گروه Sham مربوطه به مدت ۲۱ روز آل - نیم (مهارکننده نیتریک اکساید سنتتاز) به میزان ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی و سومین گروه آزمایش و گروه Sham مربوطه و گروه شاهد روزانه به مدت ۲۱ روز محلول نمکی ۰/۹٪ استریل به میزان هم حجم دارو به گروه‌های دیگر به صورت داخل صفاقی دریافت کردند و روزانه میزان اخذ آب در همه گروه‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید.

اطلاعات آماری به دست آمده با آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج آماری نشان داد که اخذ آب در زیر گروه‌های A<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> افزایش یافته در حالی که اخذ آب در گروه B<sub>3</sub> کاهش را به همراه داشت (P<۰/۰۰۱). مطالعه آماری اخیر نشان داد که نیتریک اکساید نقش مهم و قابل ملاحظه‌ای در کاهش اخذ آب در رت‌های کلستاتیک موش رت دارد.

**واژگان کلیدی:** کلستاز، اخذ آب، نیتریک اکساید، رت

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۲

### مقدمه

کلستاز یا یرقان انسدادی به اختلال در جریان صفرا در هر نقطه‌ای از غشاء قاعده‌ای - جانبی هپاتوسیت‌ها تا محل ورود مجرای صفراوی به داخل دئودنوم اطلاق می‌شود (۷)، که

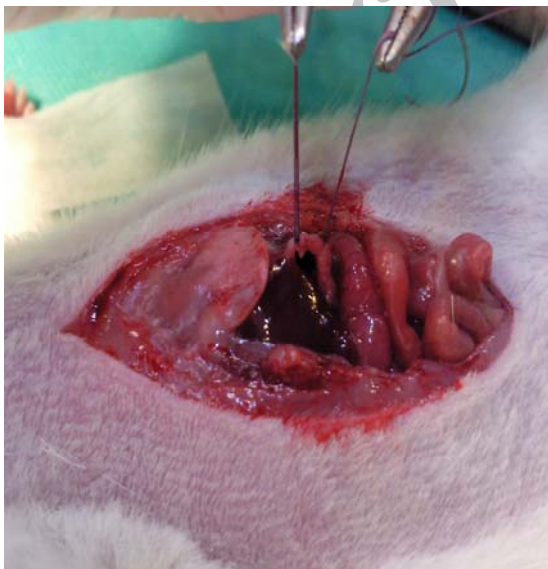
می‌تواند به صورت خارج کبدی یا داخل کبدی باشد. کلستاز در اثر عوامل مختلفی از جمله سنگ‌های مجرای صفراوی، نئوپلاسم‌ها، کیست‌های کلدوک، برخی بیماری‌های ویروسی، بعضی داروها و بسیاری علل دیگر ممکن است رخ دهد (۸).

\* گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. (e-mail: bpvahab@gmail.com)

۲- گروه آموزشی علوم پایه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران - ایران.

و غذای یکسان نگهداری شدند. جهت ایجاد کلستاز، در رت‌های گروه‌های آزمایش بر اساس الگوی لیگاتور دوبل (۷) مجرای مشترک صفراوی بسته شد (نگاره ۱)، ولی در گروه‌های Sham فقط یک لیگاتور شل بر روی مجرای صفراوی قرار داده شد (۱۱ و ۱۳). قبل از هوشیاری، رت‌ها به داخل قفس‌های انفرادی با دسترسی آسان به آب و غذا انتقال یافتند.

۲۴ ساعت پس از جراحی گروه  $A_1$  و  $B_1$  تحت تزریق آمینوگوانیدین به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، گروه  $A_2$  و  $B_2$  تحت تزریق ال-نیم به میزان ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و گروه  $A_3$ ،  $B_3$  و  $C$  تحت تزریق محلول نمکی ۰/۹٪ استریل به میزان هم حجم تزریق دارو به سایر حیوانات، روزانه به صورت داخل صفاقی به مدت ۲۱ روز قرار گرفتند. برای هر رت ظرف آب مخصوص حاوی پیت مدرج با دقت ۰/۱ میلی لیتر داخل قفس قرار داده شد و هر روز ساعت ۱۰ صبح میزان آب مصرفی هر رت اندازه گیری و ثبت شده و دوباره ظرف‌ها با میزان معینی آب پر می‌شد. اطلاعات به دست آمده از مطالعه تجربی حاضر با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه آزمون توکی (Tukey) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.



نگاره ۱- لیگاتور دوبل در مجرای صفراوی جهت ایجاد کلستاز

بر اساس گزارشات ارائه شده در رابطه با بیماران مبتلا به کلستاز، کاهش تمایل به نوشیدن آب کاملاً جلب توجه می‌کند و این مسئله در روند بهبودی این بیماران اختلالاتی را به وجود می‌آورد (۱۴). محققان نشان داده‌اند که بستن مجرای صفراوی به طور تجربی در رت‌ها و ایجاد کلستاز منجر به ایجاد تغییراتی در سطح پلاسمایی برخی عوامل درون‌زا از جمله نیتریک اکساید می‌شود (۱۱ و ۱) و از طرفی تحقیقات دیگر نشان داده‌اند که نیتریک اکساید در مقادیر بیش از حد طبیعی در بدن می‌تواند رفتار ضد تشنگی ایجاد کند (۱۲ و ۱۳، ۱۱).

با توجه به اینکه در بیماران کلستاتیک نیتریک اکساید درون‌زا افزایش یافته و اخذ آب کاهش می‌یابد محققان تحقیق حاضر، با بهره‌گیری از الگوی تجربی ایجاد کلستاز در رت، استفاده از آمینوگوانیدین، مهارکننده نیتریک اکساید، و ان-نیتروال-آرژنین متیل استر (L-NAME)، مهارکننده آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (NOS)، به بررسی احتمال تاثیر افزایش نیتریک اکساید درون‌زا، بر کاهش اشتها به آب در رت‌های کلستاتیک تجربی نمودند.

## مواد و روش کار

در مطالعه حاضر از ۴۲ سر رت نر بالغ نژاد ویستار با وزن  $210 \pm 10$  گرم و سن ۱۰ هفته استفاده گردید. رت‌های مورد مطالعه از مرکز تحقیقات انستیتو پاستور ایران تهیه و پس از انتقال به محل انجام تحقیق به مدت یک هفته تحت شرایط یکسان از نظر دما، رطوبت و نور (دما  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد، رطوبت  $52 \pm 2$  درصد و ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت خاموشی) و آب لوله کشی شهری و غذای پلت مخصوص رت نگهداری شدند.

حیوانات به طور تصادفی به هفت گروه شش تایی شامل سه گروه آزمایش ( $A_1$ ،  $A_2$  و  $A_3$ )، سه گروه Sham ( $B_1$ ،  $B_2$  و  $B_3$ ) و یک گروه شاهد C تقسیم گردیدند و سپس هر یک از رت‌های هر گروه در قفس‌های انفرادی با دسترسی آزاد به آب

## نتایج

( $P < 0/001$ ) کمتر آب نوشیده بودند. رت‌های کلستاتیک گروه  $A_2$  نسبت به گروه  $B_2$  و گروه  $C$  به طور معنی‌داری ( $P < 0/001$ ) کمتر آب نوشیده بودند. تمایل به اخذ آب در رت‌های گروه  $A_3$  نسبت به رت‌های گروه  $B_3$  و رت‌های گروه  $C$  کاهش نشان داد. میزان اخذ آب در گروه  $A_1$  و  $A_2$  نسبت به رت‌های گروه  $A_3$  افزایش معنی‌داری ( $P < 0/001$ ) را نشان داد ولی اختلاف معنی‌داری ( $P > 0/05$ ) در تمایل به اخذ آب در گروه‌های  $A_1$  و  $A_2$  نسبت به یکدیگر مشاهده نشد. میزان اخذ آب در رت‌های گروه‌های  $B_1$  و  $B_2$  نسبت به گروه  $B_3$  اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0/05$ ). از سویی در رت‌های گروه‌های  $B_1$ ،  $B_2$  و  $B_3$  نسبت به رت‌های گروه  $C$  تفاوت معنی‌داری ( $P > 0/05$ ) در اخذ آب دیده نشد.

۲۴ ساعت پس از انسداد مجرای صفراوی (Bile Duct Ligation) علامت کلستاز در گروه‌های آزمایش به صورت تیره شدن رنگ ادرار، روشن شدن مدفوع، زردی گوش‌ها، دم و پوست مشاهده شد. ولی هیچ یک از این علائم در گروه‌های Sham مشاهده نشد.

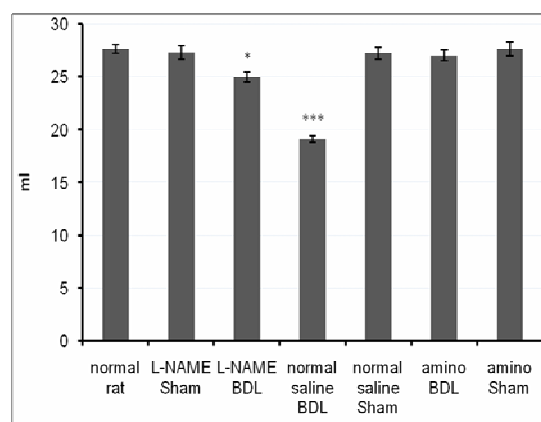
میزان اخذ آب در رت‌های گروه  $A_1$  که کلستاتیک شده بودند نسبت به گروه  $B_1$  که در آنها روی مجرای صفراوی لیگاتور شل قرار داده شده بود ولی به هر دو گروه روزانه ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن آمینوگوانیدین، به صورت داخل صفاقی به مدت ۲۱ روز تزریق می‌شد و گروه  $C$  که روزانه هم حجم آمینوگوانیدین محلول نمکی ۰/۹٪ استریل به صورت داخل صفاقی دریافت می‌کرد، به طور معنی‌داری

جدول ۱- میانگین و خطای استاندارد اخذ آب گروه‌های کلستاتیک و غیر کلستاتیک

نام گروه	وضعیت حیوان	داروی مصرفی	میانگین مصرف آب بر حسب میلی لیتر در روز	خطای استاندارد
$A_1$	کلستاتیک	آمینوگوانیدین	۲۷/۰۴	۰/۵۲
$A_2$	کلستاتیک	ال-نیم	۲۵/۰۱	۰/۴۶
$A_3$	کلستاتیک	محلول نمکی ۰/۹٪ استریل	۱۹/۱۳	۰/۳۳
$B_1$	Sham	آمینوگوانیدین	۲۷/۶۸	۰/۶۳
$B_2$	Sham	ال - نیم	۲۷/۳۲	۰/۶۷
$B_3$	Sham	محلول نمکی ۰/۹٪ استریل	۲۷/۲۴	۰/۵۹
$C$	طبیعی	محلول نمکی ۰/۹٪ استریل	۲۷/۶۹	۰/۴۱

## بحث

در مطالعات صورت گرفته بر روی بیمارانی که دچار انسداد مجرای صفراوی شده بودند، کاهش تمایل به اخذ آب بسیار جلب توجه می‌کند و این مسئله می‌تواند اختلالات ناشی از کلستاز را تشدید نموده و بهبودی این بیماران را به تاخیر اندازد (۱۴). محققان نشان داده‌اند که بستن مجرای صفراوی به طور تجربی و ایجاد کلستاز منجر به کاهش رفتار تشنگی در رت‌ها می‌شود، از طرفی نشان داده شده است که در بیماران کلستاتیک نیتریک اکساید درون زا افزایش می‌یابد (۱۲ و ۱۱) و از



نمودار ۱- مقایسه میانگین میزان اخذ آب در گروه‌های کلستاتیک و غیر

کلستاتیک \*\*\*  $P < 0/001$ , \*  $P < 0/05$

در تحقیق دیگری نشان داده شده است که تزریق نیتریک اکساید در ناحیه پیش بینایی در رت‌هایی که تشنگی در آنها به وسیله محرومیت از آب تحریک شده بود اثر مهارى دارد در ایجاد اثر ضد تشنگی القا شده به وسیله آندوتوکسین اشرشیاکولی و عامل نکروز دهنده تومور (TNF- $\alpha$ ) نقش دارد (۶ و ۷).

در تحقیق حاضر رت‌های کلستاتیک به طور معنی‌داری کاهش تمایل به آب را نشان دادند و میزان تمایل به اخذ آب در گروه‌هایی که برای آنها آمینوگوانیدین استفاده شده بود، نسبت به گروهی که برای آنها محلول نمکی ۰/۹٪ استریل تجویز شده بود، افزایش معنی‌داری ( $P < 0/001$ ) نشان داد. در گروهی که برای آنها ال-نیم استفاده شده بود نیز تمایل به اخذ آب نسبت به گروهی که محلول نمکی ۰/۹٪ استریل دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری ( $p < 0/001$ ) افزایش نشان می‌داد و این نشان می‌دهد که در بیماران کلستاتیک افزایش نیتریک اکساید درون‌زا می‌تواند از علل کاهش تمایل به اخذ آب باشد. ولی افزایش میزان اخذ آب در دو گروهی که دارو گرفته بودند نسبت به هم تفاوت معنی‌داری ( $p > 0/05$ ) نشان نداد و این نشان می‌دهد که هم مهار ساخت نیتریک اکساید و هم مهار نیتریک اکساید تولید شده در بدن بر تمایل اخذ آب موثر می‌باشد و این مسئله مجدداً تأثیر نیتریک اکساید را در تنظیم رفتار تشنگی در بیماران کلستاتیک تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که به هر طریقی جلوی عملکرد نیتریک اکساید گرفته شود (با مهار ساخت نیتریک اکساید یا مهار نیتریک اکساید ساخته شده در بدن) می‌تواند کاهش تمایل به اخذ آب را در بیماران کلستاتیک، اصلاح نماید. از آنجایی که در هر دو گروه Sham (هم گروهی که آمینوگوانیدین و هم گروهی که ال-نیم دریافت می‌کردند) میزان اخذ آب تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان نداد ( $p > 0/05$ )، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نیتریک اکساید در مقادیر طبیعی در بدن اثرات ضد تشنگی نداشته و منجر به کاهش تمایل به نوشیدن نمی‌شود.

طرف دیگر نیتریک اکساید اعمال بیولوژیکی متفاوتی از جمله تأثیر در تنظیم اشتها به آب و غذا دارد (۱۲ و ۱۰).

تجویز داخل مغزی ال-آرژینین و در نتیجه آزاد شدن نیتریک اکساید منجر به کاهش تمایل اخذ آب در رت‌هایی می‌شود که در آنها تشنگی به وسیله محرومیت از آب یا تزریق داخل بطن مغزی آنژیوتانسین II تحریک شده بود ولی نیتریک اکساید در مقادیر طبیعی در بدن منجر به کاهش تشنگی نمی‌شود (۴ و ۲)، تجویز مهار کننده نیتریک اکساید (L-NAME) در رت‌هایی که محرومیت از آب داشتند با اثر ال-آرژینین مخالفت کرده و مانع اثر ضد تشنگی آن می‌شود. تزریق ال-آرژینین به ناحیه پیش بینایی به طور معنی‌داری منجر به کاهش اخذ آب در رت‌هایی که محرومیت از آب داشتند می‌شود، در حالی که تزریق ال-آرژینین با همین مقدار به داخل بطن مغز چنین اثری را ندارد ولی با مقدار بالاتر می‌تواند موثر باشد. تزریق ال-آرژینین به صورت داخل بطن مغزی، تشنگی را که به وسیله تزریق داخل بطن مغزی آنژیوتانسین II تحریک می‌شود را مهار می‌کند ولی این اثرات وابسته به مقدار هستند. این تحقیقات نشان می‌دهند که نیتریک اکساید زمانی که تشنگی به وسیله محرومیت از آب یا تجویز آنژیوتانسین II تحریک می‌شود می‌تواند اثر مهارى داشته باشد و ناحیه پیش بینایی (Pre-optic area) ممکن است یکی از نواحی مرکزی اثر ضد تشنگی نیتریک اکساید باشد (۴ و ۹، ۴، ۲).

محققان دریافته‌اند که تجویز داخل بطن مغزی ال-آرژینین با افزایش فشار خون که به وسیله تجویز داخل بطن مغزی آنژیوتانسین II القا شده بود مقابله می‌کند و از طرفی تجویز داخل بطن مغزی آنژیوتانسین II منجر به کاهش فعالیت نیتریک اکساید سنتتاز در کورتکس، دیانسفال و ساقه مغز می‌شود، و از این یافته‌ها چنین بر می‌آید که نیتریک اکساید و آنژیوتانسین II می‌توانند در مغز اثراتی ضد یکدیگر در تنظیم فشار خون و رفتار تشنگی داشته باشند، یعنی اگر آنژیوتانسین II منجر به افزایش و تحریک رفتار تشنگی و در نتیجه افزایش فشار خون می‌شود، نیتریک اکساید منجر به کاهش این اثرات می‌گردد (۱۳ و ۴، ۵، ۳، ۲).

nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Medical Sciences*. 86: 5159-5162.

11. Mani, A.R., Nahavandi, A., Mani, A.H., Dehpour, A., (2001): Role of nitric oxide in hypodispia of rats with obstructive cholestasis. *J Pharm Pharmacol*. 53(2):277-281.
12. Martinez-Rodenas, F., Oms, L.M., Carulla, X., Segura, M., Sancho, J.J., Piera, C., Fernandez-Espina, M.R., Sitges-Serra, A. (1989): Measurement of body water compartments after ligation of the common bile duct in the rabbit. *Br j Surg*. 76(5):461-464.
13. Nahavandi, A., Dehpour, A., Mani, A.R., Homayounfar, H., Abdoli, A., Abdolhoseini, M.R., (2000): The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *European Journal of Pharmacology*. 411(1-2):135-141.
14. Oms, L., Martinez-Rodenas, F., Valverde, J., Jimenez, W., Sitges Werra, A. (1990). Reduced water and sodium intake associated with high levels of natriuretic factor following common bile duct ligation in the rabbit. *Br J Surg*. 77(7):752 -755.

## فهرست منابع

1. Baron, V., Hernandez, J., Noyola, M., Escalante, B., Muriel, P., (2000): *Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia*. *Comp Biochem Physical C Toxicol Pharmacol*. 127: 243-249.
2. Calapai, G., Marciano, M.C., Costantino, G., Russo, A., Corica, F., Sautebin, L., Rosa, M., Caputi A.P., (1998): Effects of water deprivation and angiotensin II intracerebroventricular administration on brain nitric oxide synthase activity. *European journal of pharmacology*. 360(2-3):147-54.
3. Calapai, G., Caputy, A.P., (1996): Nitric oxide and drinking behavior, *Regul pept*. 66(1-2):117 - 121.
4. Calapai, G., Mazzaglia, G., Cilia, M., Zingarelli, B., Squadrito, F., Caputi, A.P., (1994): Mediation by nitric oxide formation in the preoptic areas of endotoxin and tumour necrosis factor-induced of water intake in the rat. *Br. J. Pharmacol*. 111(4):1328-32.
5. Calapai, G., Squadrito, F., Alitavilla, D., Zingarelli, B., Campo, G.M., Cillia, M., Capuri, A.P., (1992): Evidence that nitric oxide modulates drinking behaviour. *Neuropharmacology*. 31(8):761-764.
6. Calapai, G., Sauadrito, F., Massi, M., Caputi, AP., de Caro, G., (1990): Endotoxin inhibition of drinking behaviour in the rat. *Pharmacol Res*. 22(2): 161-170.
7. Cameron, G.R., Oakley, C.L., (1932): Ligation of the common bile duct. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 35(5): 769-798.
8. Haber, M.H., (1962): Histopathological changes in the obstructed common bile duct. *The Journal of the Pathological Society*. 84(2): 413-420.
9. Kadekaro, M., Terrell, M.L., Harmann, P., Summy-Long, J.Y., (1994): Central inhibition of nitric oxide synthase attenuates water intake but dose not alter enhanced glucose utilization in the hypothalamo-neurohypophysial system of dehydrated rats. *Neurosci Lett*. 173(1-2): 115-118.
10. Knowles, R.G., Palacios, M., Palmer, R.M.J., Moncada, S., (1989): Formation of