مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره اول، فروردین ۹۵
صفحه ۱ الی ۱۰

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر لوزارتان (مهارگر گیرنده AT1) بر میزان رادیکال‌های آزاد نیتروژن و عملکرد کلیه پس از ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه در موش صحرایی

سعیده بارفروش[۱]، محمدتقی محمدی[۲*]، جواد رئوف سرشوری[۲]

[۱]دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام‌نور تهران شرق، تهران، ایران.

[۲]دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: فعال‌شدن گیرنده AT1 (گیرنده نوع-۱ آنژیوتانسین-II)، نقش مهمی در پاتوژنز آسیب‌های ناشی از ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه دارد. در مطالعه حاضر، تأثیر لوزارتان بر میزان رادیکال‌های آزاد نیتروژن (RNS) و عملکرد کلیه در آسیب‌های ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه در موش صحرایی بررسی شد.

روش بررسی: ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به سه گروه شاهد، کنترل ایسکمی و ایسکمی درمان تقسیم شدند. ایسکمی با انسداد شریان‌های کلیه، به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. لوزارتان (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یک‌ساعت قبل ایسکمی، همچنین ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد ایسکمی، به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. نمونه‌های خونی برای سنجش کراتینین، قبل و ۷۲ ساعت بعد ایسکمی، جمع‌آوری شدند. در نهایت، غلظت NOx و تغییرات آسیب‌شناختی بافت کلیه، ۷۲ ساعت بعد ایسکمی ارزیابی شد.

یافته‌ها: میانگین غلظت کراتینین خون حیوانات گروه شاهد و کنترل ایسکمی در شروع آزمایش به ترتیب برابر با ۰/۲۱±۰/۳۷ و ۰/۱۴±۰/۲۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود. القای ایسکمی، غلظت کراتینین را به‌طور معنی‌داری (۲/۲۶±۲/۷۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در گروه کنترل ایسکمی افزایش داد (p=۰/۰۲۰). غلظت NOx در گروه کنترل ایسکمی (۵/۹۳±۲۹/۴۹ نانومول بر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با گروه شاهد (۰/۲۳±۱/۰۰ نانومول بر میلی‌گرم پروتئین)، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۰۱). لوزارتان میزان کراتینین (۰/۵۲±۰/۶۸ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) را در گروه ایسکمی درمان به‌طور معنی‌داری (p=۰/۰۴۴) کاهش داد، و باعث کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در سطح NOx کلیه در حیوانات ایسکمی درمان‌شده به همراه تغییرات آسیب‌شناختی شد (۵۳٪).

نتیجه‌گیری: استفاده از لوزارتان می‌تواند با کاهش RNS، از آسیب‌های ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه، به‌طور مؤثری جلوگیری و باعث بهبود عمکرد کلیه ایسکمی گردد.

کلید واژه‌ها: ایسکمی- خون‌رسانی مجدد؛ لوزارتان؛ آنژیوتانسین-II؛ گونه فعال نیتروژن.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
محمدتقی محمدی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۹

تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۲۶

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Baarforoush S, Mohammadi MT, Raouf Sarshori J. The effect of Losartan (AT1 Receptor Inhibitor) on reactive nitrogen species and renal function after renal Ischemia-reperfusion in rat. Qom Univ Med Sci J 2016;10(1):1-10.

مقدمه

آسیب‌های ایسکمی در بافت‌های مختلف حیاتی بدن از جمله قلب، مغز و کلیه، سبب بروز مرگ و میر گسترده در سراسر جهان می‌شود (۱). در این میان، ایسکمی کلیه به دلایل زیادی مانند تروماهای کلیه، جراحی‌ها، نفروپاتی دیابتی، مشکلات اورولوژی و گرفتگی شریان‌های کلیه، ایجاد و باعث آسیب‌های جبران‌ناپذیری در کلیه می‌شود (۳،۲). در مرحله ایسکمی که با کاهش تولید انرژی از میتوکندری همراه است، هموستاز یون‌ها از جمله سدیم و کلسیم، دچار اختلال می‌شود. افزایش سدیم نیز باعث ادم سیتوتوکسیک شده و تجمع کلسیم با فعال‌کردن آنزیم‌های هیدرولاز (فسفولیپازها) و پروتئاز (کالپین‌ها)، منجر به تخریب ماکرومولکول‌های حیاتی سلول می‌گردد (۳،۲). طبق نتایج تحقیقات انجام‌شده، بعد از ایسکمی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، ضعیف و با تجمع رادیکال‌های آزاد، آسیب استرس اکسیداتیو آغاز می‌شود (۴،۱). از طرفی با شروع مرحله خون‌رسانی مجدد، تعداد گسترده‌ای از عوامل مخرب همچون پاسخ‌های التهابی، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، نیتروژن (RNS) و سیستم رنین - آنژیوتانسین موضعی فعال شده و باعث صدمات گسترده به بخش‌های عملکردی نفرون‌ها می‌گردد (۶،۵،۳). نیتریک اکساید (NO)، یک رادیکال آزاد بسیار فعال بوده و به‌وسیله آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (NOS)، تولید می‌شود. این آنزیم دارای ایزوفرم‌های متفاوت شامل: اندوتلیالی (eNOS)، نورونی (nNOS) و القایی (iNOS) بوده که اثرات بیولوژیکی متفاوتی دارند (۸،۷). مطالعات نشان می‌دهد فرم القایی درپی ایسکمی‌های کلیه فعال شده و اثرات مخربی بر ساختار و عملکرد کلیه می‌گذارد (۷). در نهایت، طبق یافته‌های Chatterje و Mark، مهار انتخابی این آنزیم، از اختلال عملکرد کلیه جلوگیری و غلظت نیتریک اکساید را به مقدار زیادی کاهش می‌دهد (۹،۸). از طرفی، سیستم رنین - آنژیوتانسین موضعی بافت کلیه در حین آسیب‌های ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه فعال شده و نقش مهمی در پاتوژنز این آسیب‌ها برعهده دارد (۱۰). آنژیوتانسین –II نیز از طریق فعال‌کردن گیرنده AT1، اثرات سمّی روی سلول‌های بافت کلیه می‌گذارد، اما از طریق گیرنده AT2، نقشی محافظتی داشته که باعث پیچیدگی عملکرد آن می‌شود (۶،۱۰،۱۱). نتایج مطالعات نشان داده است مهار تولید آنژیوتانسین –II و یا عملکرد آن سبب کاهش آسیب‌های حاد ناشی از ایسکمی کلیه می‌گردد (۱۳،۱۲). مطالعه Srisawat و همکاران نشان داد مهار تولید آنژیوتانسین –II به‌وسیله کاپتوپریل (مهارکننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین –I به آنژیوتانسین –II) و لوزارتان (آنتاگونیست گیرنده AT1)، منجر به افزایش جریان پلاسمایی کلیه و فیلتراسیون گلومرولی (GFR) درپی آسیب‌های ایسکمی کلیه می‌شود (۱۳). در مطالعه دیگری، Ivanov و همکاران نشان دادند استفاده از آنتاگونیست گیرنده AT1، اثرات مفید در بیماران فشار خون بالا داشته و از آسیب‌های نارسایی کلیوی حاد ناشی از ایسکمی همچون نکروز نواحی قشر و مدولای کلیه جلوگیری می‌کند (۱۱). نتایج این بررسی نشان داد فعال‌شدن گیرنده AT1، سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (۱۱). همچنین در مطالعه Rajagopalan مشخص گردید آنژیوتانسین–II در طول ایسکمی ناشی از نارسایی کلیه، فعالیت و بیان آنزیم NADPH- اکسیداز را به‌عنوان منبع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌دهد (۱۰). مطالعه Baririlli و همکاران نیز نشان داد فعال‌شدن سیستم رنین - آنژیوتانسین موضعی کلیه سبب فیبروز توبولی فضای میان‌بافتی پس از ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه شده که استفاده از لوزارتان شدت این آسیب را کاهش می‌دهد (۱۲). با این حال، ارتباط بین فعال‌شدن گیرنده آنژیوتانسین –II (AT1) و غلظت رادیکال‌های آزاد نیتروژن (NO) پس از ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه مشخص نیست. بر این اساس در مطالعه حاضر اثر مهار گیرنده اختصاصی آنژیوتانسین –II (AT1) با استفاده از لوزارتان بر میزان رادیکال‌های آزاد نیتروژن (NO) و عملکرد کلیه در مدل تجربی آسیب‌های ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این تحقیق مداخله‌ای - تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) تهیه‌شده از مرکز پژوهشی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد.

در تمامی آزمایشها، شرایط کار با حیوانات آزمایشگاهی تعیین‌شده توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، رعایت گردید. حیوانات بدون داشتن محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا (شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی با درجه حرارت ۲±۲۲ درجه سانتیگراد) در طی آزمایش نگهداری شدند.

جهت القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه، ابتدا حیوانات با محلول ترکیبی کتامین (میزان ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند و در ادامه، بعد از خوابانیدن حیوان به پشت و تراشیدن موهای زائد، محل مورد نظر ضدعفونی و برشی به طول ۴ سانتی‌متر در ناحیه قدامی شکم ایجاد شد. بعد از کنار زدن احشای شکم، هر دو شریان کلیه از بافت‌های اطراف مجزا شده و سپس با استفاده از دو میکروکلمپ، انسداد شریان‌های کلیه به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. در تمامی مراحل سعی گردید تا هر دو کلیه با استفاده از گاز آغشته به نرمال سالین، مرطوب نگهداری شوند. در پایان مرحله ایسکمی، مرحله خون‌رسانی مجدد به مدت ۷۲ ساعت با برداشتن میکروکلمپ‌ها از روی شریان‌های کلیه آغاز شد. پس از اطمینان از برقراری مجدد جریان خون (خون‌رسانی مجدد)، نواحی برش‌خورده شکم به‌دقت دوخته شد و کمی از پودر پنی‌سیلین G به نواحی برش‌خورده به‌طور موضعی اضافه گردید. بعد از هوشیاری کامل، حیوانات در قفس‌های جداگانه قرار گرفته و به محل نگهداری منتقل شدند.

جهت انجام پروژه حاضر، ۱۸ سر موش صحرایی در ۳ گروه مجزای ۶ تایی به‌صورت تصادفی به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه شاهد جراحی: در حیوانات این گروه، جراحی بر روی شکم انجام شد، ولی انسداد شریان‌های کلیه و ایسکمی ایجاد نشد؛

۲- گروه کنترل ایسکمی: در حیوانات این گروه پس از انجام جراحی شکم، انسداد هر دو شریان کلیه به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت؛

۳ - گروه ایسکمی و لوزارتان: در حیوانات این گروه پس از انجام جراحی شکم، انسداد هر دو شریان کلیه به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد.

حیوانات این گروه، داروی لوزارتان را در ۴ مرتبه تزریق به ترتیب یک‌ساعت قبل از ایسکمی، همچنین ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد ایسکمی، به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. در ضمن، حیوانات گروه شاهد و کنترل ایسکمی معادل حلال لوزارتان (نرمال سالین)، در همان زمانهای دریافت دارو، نرمال سالین را نیز دریافت کردند. در انتهای دوره آزمایش (پایان روز سوم)، تمامی حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و بعد از نمونه‌برداری خون جهت سنجش کراتینین، بافت کلیه حیوانات جدا و سپس به سرعت به داخل نیتروژن مایع و سپس فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل گردید.

جهت اندازه‌گیری کراتینین خون (قبل از القای ایسکمی و پایان روز سوم) از کیت تشخیص کمّی کراتینین سرم با روش نورسنجی (پارس آزمون، تهران، ایران) استفاده شد. در این آزمایش کراتینین با آلکالن پیکرات، تشکیل کمپلکس رنگی داد که شدت رنگ ایجادشده متناسب با مقدار کراتینین در نمونه بود. جهت اندازه‌گیری، محلول هیدروکسید سدیم و اسیدپیکریک به ترتیب به نسبت ۴ به ۱ با هم مخلوط شدند. سپس با استفاده از سمپلر به مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد، به ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول آماده‌شده اضافه و ۶۰ ثانیه بعد از مخلوط کردن نمونه‌ها یا استاندارد با محلول مورد نظر، جذب نوری اولیه و ۲ دقیقه بعد، جذب نوری ثانویه در طول موج ۵۰۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر (CECIL-2501, England) قرائت شد. در نهایت، غلظت کراتینین خون برحسب میلی‌گرم بر دسی‌لیتر با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

غلظت کراتینین (mg/dl)=[اختلاف جذب نوری نمونه/اختلاف جذب نوری استاندارد]×غلظت محلول استاندارد (mg/dl)

اندازه‌گیری میزان نیترات (NOx) با استفاده از روش گریس انجام شد. در روز آزمایش، بافت کلیه منجمدشده به‌دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنیزه شد و پس از آن نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ گرم و ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت سنجش نیترات استفاده گردید. سپس با استفاده از سولفات روی، پروتئین‌زدایی نمونه‌ها انجام گرفت و در مرحله بعد، با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید وانادیوم III (۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، احیای نیتریت به

نیترات صورت گرفت. در ادامه، محلول گریس {به میزان ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید (۲٪) و ۵۰ میکرولیتر اتیلین دی‌آمید دی‌هیدروکلرید (۱٪)} اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس رنگ به‌دست‌آمده در طول موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت شد و جذب نمونه‌ها با جذب استاندارد (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیترات) مقایسه و غلظت نمونه‌ها محاسبه گردید. در نهایت، غلظت NOx برحسب نانومول/میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

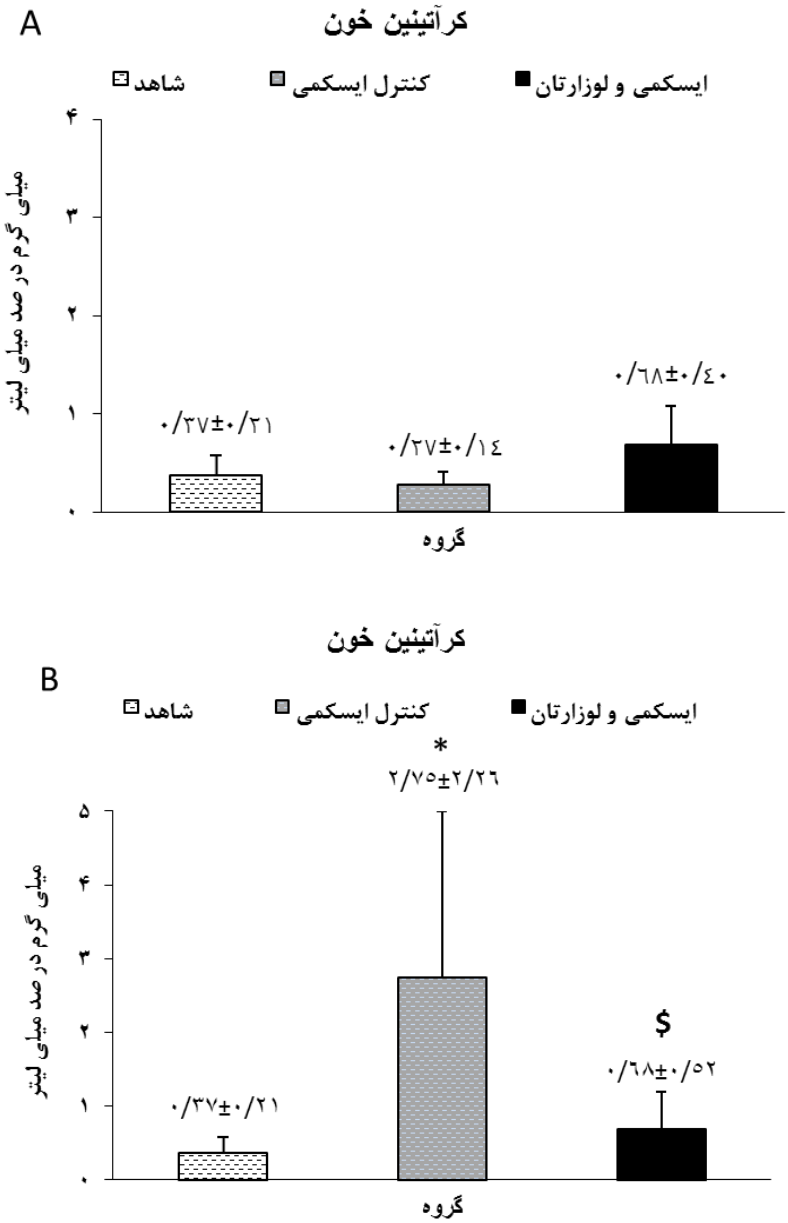
برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۱۴). بدین منظور با برداشتن حجم معینی از عصاره بافتی با رقت مناسب، حجم آن به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول برادفورد با رقت ۱:۳ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر جذب قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد نیز ابتدا محلول ۱ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه گردید. سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن ساخته و به‌عنوان غلظت‌های استاندارد استفاده شد.

جهت مطالعه میکروسکوپی، ابتدا نمونه مورد نظر (بافت کلیه) به مدت ۲ هفته جهت تثبیت در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت و سپس بقیه مراحل به شرح زیر انجام شد. ابتدا مراحل پاساژ بافت و بعد قالب‌گیری با پارافین طبق روش‌های روتین آماده‌سازی بافت صورت گرفت. سپس مرحله برش‌گیری به‌وسیله دستگاه میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر انجام شد. در ادامه، مقاطع تهیه‌شده در محل مورد نظر بر روی لام منتقل و برش‌ها با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، برش‌های تهیه‌شده، آبگیری و شفاف‌سازی شدند و در ادامه، فرآیند مانت کردن انجام گرفت. در پایان، لام‌های تهیه‌شده با دقت و به‌وسیله دستگاه میکروسکوپ نوری (Nikon) بررسی و با استفاده از دوربین مخصوص میکروسکوپ متصل به کامپیوتر (CMEX)، از نقاط مورد نظر، تصویر تهیه و شاخص‌های نکروز و آسیب گلومرولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ تجزیه و تحلیل شدند. با توجه توزیع نرمال داده‌ها، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه، آزمون تعقیبی توکی (برای مقایسه داده‌ها) و آزمون آماری تی‌تست (برای مقایسه داده‌های شروع آزمایش و پایان) استفاده گردید. در تمامی موارد، سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

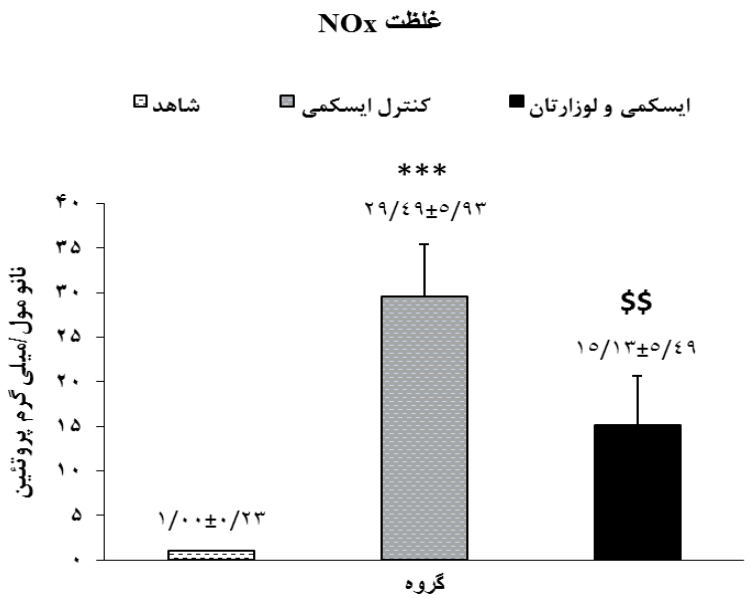
میزان کراتینین خون حیوانات گروه شاهد در شروع آزمایش، ۰/۲۱±۰/۳۷ میلی‌گرم بردسی‌لیتر بود که تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با زمان پایان آزمایش نداشت. غلظت کراتینین خون حیوانات گروه کنترل ایسکمی در شروع آزمایش، ۰/۱۴±۰/۲۷ میلی‌گرم بردسی‌لیتر بود که میزان آن بعد از القای ایسکمی افزایش یافت. در پایان آزمایش، میزان کراتینین خون، ۲/۲۶±۲/۷۵ میلی‌گرم بردسی‌لیتر بود که تفاوت معنی‌داری در مقایسه با شروع آزمایش و گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۲۰$). غلظت کراتینین خون حیوانات گروه ایسکمی دریافت‌کننده لوزارتان در شروع آزمایش، ۰/۴۰±۰/۶۸ میلی‌گرم بردسی‌لیتر بود که میزان آن مشابه با دو گروه شاهد و کنترل ایسکمی بود و در مقایسه آماری، تفاوتی بین آنها مشاهده نشد، درحالی‌که میزان کراتینین خون این حیوانات در پایان آزمایش ۰/۵۲±۰/۶۸ میلی‌گرم بردسی‌لیتر بود که در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی، کاهش معنی‌داری داشت. ($p<۰/۰۴۴$) (نمودار شماره ۱)



نمودار شماره ۱: تغییرات غلظت کراتینین خون (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) در شروع آزمایش (A) و پایان آزمایش (B) در گروه‌های مختلف آزمایشی (n=٦).
داده‌ها به‌صورت Means±SD نمایش داده شده است.
***نشانگر تفاوت معنی‌دار با p<۰/۰۲۰ در مقایسه با گروه شاهد**
$نشانگر تفاوت معنی‌دار با p<۰/۰٤٤ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی

میزان NOx بافت کلیه حیوانات گروه شاهد، ۱/۰۰±۰/۲۳ نانومول برمیلی‌گرم پروتئین بود. القای ایسکمی، میزان غلظت NOx بافت کلیه در حیوانات گروه کنترل ایسکمی را در مقایسه با گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری افزایش داد که میزان آن برابر با ۲۹/۴۹±۵/۹۳ نانومول برمیلی‌گرم پروتئین بود (p<۰/۰۰۱).

تیمار با داروی لوزارتان، میزان NOx بافت کلیه گروه ایسکمی درمان‌شده را در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی، به‌طور معنی‌داری کاهش داد (۵۳٪) و میزان آن در پایان آزمایش برابر با ۱۵/۱۳±۵/۴۹ نانومول برمیلی‌گرم پروتئین بود (p<۰/۰۰۵) (نمودار شماره ۲).



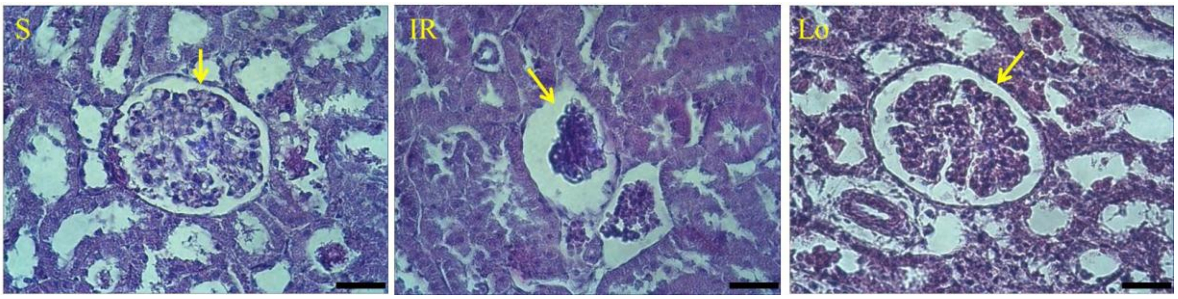
نمودار شماره ۲: تغییرات غلظت نیترات، به‌عنوان شاخص رادیکال‌های آزاد نیتروژن (NOx) بافت کلیه برحسب نانومول برمیلی‌گرم پروتئین در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی (n=٤).

داده‌ها به‌صورت Means±SD نمایش داده شده است.

*****: نشانگر تفاوت معنی‌دار با p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه شاهد.**

$$: نشانگر تفاوت معنی‌دار با p<۰/۰۰۵ در مقایسه با گروه کنترل ایسکمی.

در حیوانات گروه شاهد؛ فضای کپسول بومن و گلومرول در حالت طبیعی و سالم بود. در حیوانات گروه کنترل ایسکمی؛ اتساع فضای کپسول بومن، گلومرولواسکلروز و تخریب گلومرول‌ها، به‌وضوح در بافت کلیه مشاهده گردید. درصورتی‌که در حیوانات ایسکمی درمان‌شده با لوزارتان؛ فضای گلومرولی، مویرگ‌ها و سلول‌های سازنده گلومرول‌ها همانند حیوانات گروه شاهد، سالم به‌نظر می‌رسید (شکل).



شکل: تصویر، مقاطع عرضی بافت کلیه با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد.

در تصاویر به‌دست‌آمده از حیوانات گروه‌های شاهد (S)، گلومرول‌ها طبیعی هستند. در گروه کنترل، ایسکمی گلومرول‌ها آسیب دیده و گلومرولواسکلروز به‌وضوح مشاهده می‌شود (IR)، که میزان این آسیب در گروه درمان با لوزارتان کاهش یافته است (Lo). (Scale bars= 100 µm، 100X)

بحث

فعال‌شدن سیستم رنین - آنژیوتانسین موضعی بافت کلیه و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد نیتروژن (RNS) پس از ایسکمی کلیه، آغازگر و فعال‌کننده سیگنال‌هایی می‌باشد که در پاتوژنز مولکولی آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه، نقش اساسی داشته و باعث ایجاد آسیب‌های شدید در ساختار و عملکرد کلیه می‌شود (۱۵،۹،۳). در مطالعه حاضر القای ایسکمی - خون‌رسانی مجدد سبب اختلال در عملکرد کلیه شد که میزان کراتینین خون، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و موجب آسیب‌های بافتی قابل‌توجهی در بافت کلیه گردید. در این میان، تولید رادیکال‌های آزاد نیتروژن (NOx) نیز در بافت کلیه ایسکمی افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشت.

از طرفی، تیمار با لوزارتان توانست میزان کراتینین خون و غلظت NOx بافت کلیه حیوانات ایسکمی درمان‌شده با لوزارتان را به همراه تغییرات آسیب‌شناختی کاهش دهد.

بعد از بروز ایسکمی کلیه، تغییرات گسترده‌ای در بافت کلیه روی می‌دهد و عملکرد کلیه نیز دچار نقص می‌گردد. یکی از این تغییرات افزایش میزان کراتینین پلاسمایی است که شاخص مهمی از تغییرات فیلتراسیون گلومرولی و عملکرد کلیه می‌باشد. همان‌طورکه یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد در حیوانات گروه کنترل ایسکمی بعد از القای ایسکمی، غلظت کراتینین پلاسما در پایان آزمایش در مقایسه با گروه شاهد و قبل ایسکمی، افزایش معنی‌داری داشت که این افزایش، نشان‌دهنده احتمالی صدمه به گلومرول‌ها و کاهش فیلتراسیون گلومرولی بود. همسو با یافته‌های مطالعه حاضر، مطالعات زیادی این نتایج را به‌خوبی تأیید می‌کنند (۹). دلایل مختلفی می‌تواند باعث افزایش کراتینین خون بعد از بروز ایسکمی‌های کلیه شود که از جمله می‌توان به فعال‌شدن مسیرهای التهاب، تولید انواع رادیکال‌های آزاد، فعال‌شدن برخی سیستم‌های مخرب همچون رنین - آنژیوتانسین موضعی و فاکتور اندوتلین اشاره کرد (۹،۲). تمامی فاکتورهای ذکرشده سبب بروز نقص در عملکرد کلیه به دلیل تخریب تعداد زیادی از گلومرول‌ها و در مواردی گلومرولواسکلروز می‌شوند. نتیجه بررسی‌های آسیب‌شناختی مطالعه حاضر نیز به‌خوبی این آسیب‌های گلومرولی را در بافت کلیه نشان داد. موازی با این یافته‌ها در چند مطالعه قبلی نیز این تغییرات آسیب‌شناختی گزارش شده است (۱۷،۱۶). در مطالعه حاضر، استفاده از داروی لوزارتان توانست میزان کراتینین پلاسما به همراه تغییرات آسیب‌شناختی بافت کلیه را کاهش دهد. همسو با یافته‌های مطالعه حاضر، برخی نتایج مطالعات دیگر نیز نشان داده است که مهار تشکیل موضعی آنژیوتانسین-II و یا مهار گیرنده آن سبب کاهش آسیب‌های ناشی از ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه می‌شود (۱۳،۱۲). در مطالعه Srisawat و همکاران، مهار موضعی تولید آنژیوتانسین -II به‌وسیله کاپتوپریل و انسداد عملکرد گیرنده آن به‌واسطه آنتاگونیست گیرنده AT1 (لوزارتان) پس از آسیب‌های ایسکمی کلیه باعث بهبود فیلتراسیون گلومرولی به همراه افزایش جریان خون کلیه گردید (۱۳).

این نتایج در چند مطالعه مشابه نیز مورد تأیید قرار گرفته که نشان می‌دهند مهار سیستم رنین- آنژیوتانسین موضعی کلیه پس از ایسکمی - خون‌رسانی مجدد، از تغییرات آسیب‌شناختی بافت کلیه همچون آسیب توبولی، آسیب به گلومرول‌ها و سایر صدمات بافتی جلوگیری می‌کند (۱۲،۱۱). با توجه به این موضوع که گیرنده آنژیوتانسین-II، سیگنال‌های مخرب گسترده‌ای همچون کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، آنزیم‌های تولیدکننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن (NADPH-اکسیداز) و نیتروژن (NOS القائی)، فسفولیپاز -C و افزایش کلسیم داخل سلولی را در داخل سلول فعال می‌کند (۱۵) (۲۰-۱۸)، با مهار این گیرنده، تمامی مسیرهای مخرب فعال‌شده مهار خواهند شد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد در مطالعه حاضر استفاده از لوزارتان (آنتاگونیست گیرنده AT1) تمامی مسیرهای مخرب ذکرشده را که با فعال‌شدن گیرنده AT1 فعال می‌شوند، مهار و با جلوگیری از تخریب گلومرول‌ها و سایر آسیب‌های ناشی از ایسکمی سبب کاهش میزان کراتینین پلاسما شده است.

براساس یافته‌های مطالعه حاضر، غلظت نیترات بافت کلیه به‌عنوان شاخص تولید رادیکال‌های آزاد نیتروژن در حیوانات گروه کنترل ایسکمی، افزایش قابل‌ملاحظه‌ای داشت. نتایج مطالعات اخیر نیز نشان داده است فرم القایی NOS درپی ایسکمی‌های کلیه، فعال شده و با تولید گسترده نیتریک اکساید در بافت کلیه، اثرات مخرب بر ساختار و عملکرد کلیه دارد (۲۱،۷). این یافته‌ها با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر همخوانی داشت؛ چراکه میزان نیترات حاصل از متابولیزه‌شدن نیتریک اکساید، به مقدار زیادی در بافت کلیه ایسکمی افزایش داشته است. نتایج یافته‌های Chatterjee و همکاران نیز نشان داد نوع القائی NOS بعد از آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه القا می‌گردد (۹). همچنین در یافته‌های Kinaci و همکاران مشخص گردید میزان mRNA آنزیم iNOS بعد از ایسکمی- خون‌رسانی مجدد کلیه، افزایش پیدا می‌کند (۲۲). بر این اساس به‌نظر می‌رسد در مطالعه حاضر، افزایش بیان آنزیم iNOS بعد از ایسکمی کلیه سبب افزایش تولید گسترده در میزان نیتریک اکساید بافت کلیه شده است. در مطالعه حاضر، میزان نیترات بافت کلیه در حیواناتی‌که لوزارتان (آنتاگونیست گیرنده AT1) دریافت کرده بودند، به‌طور

قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافت. به‌نظر می‌رسد افزایش تولید نیتریک اکساید یکی از مسیرهای سیگنالی گیرنده AT1 باشد؛ زیرا در مطالعه Shirai مشخص گردید آنژیوتانسین-II سبب فعال شدن مسیر نیتریک اکساید-گوآنوزین منوفسفات حلقوی در توبول پروکسیمال می‌شود (۲۰). همچنین در مطالعه حاضر استفاده از لوزارتان به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده AT1 از تولید و تجمع نیتریک اکساید در بافت کلیه جلوگیری کرد. لذا تعیین اثر این آنتاگونیست بر میزان فعالیت و بیان آنزیم iNOS پس از ایسکمی کلیه، نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از مهارکننده اختصاصی گیرنده AT1 (لوزارتان)، به‌طور مؤثری عملکرد کلیه را بهبود بخشیده و از آسیب به بافت کلیه جلوگیری می‌کند. همچنین به‌نظر می‌رسد مهار این گیرنده به‌واسطه لوزارتان از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد نیتروژن (NOx) سبب کاهش آسیب‌های ایسکمی - خون‌رسانی مجدد کلیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین وسیله از گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله جهت فراهم کردن مقدمات انجام پروژه حاضر، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از خانم‌ها کفایت بغلانی و فاطمه سالم جهت مساعدت در انجام تحقیق حاضر تقدیر می‌گردد.

References:

1. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: A review. Transplant Proc 2007;39(2):481-4.

2. Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. J Renal Inj Prev 2015;4(2):20-7.

3. Slegtenhorst BR, Dor FJ, Rodriguez H, Voskuil FJ, Tullius SG. Ischemia/reperfusion injury and its consequences on immunity and inflammation. Curr Transplant Rep 2014;1(3):147-54.

4. Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. Int J Cardiol 1997;58(2):95-117.

5. Patschan D, Patschan S, Muller GA. Inflammation and microvasculopathy in renal ischemia reperfusion injury. J Transplant 2012;2012:764154.

6. Jang HS, Kim JI, Kim J, Park JW, Park KM. Angiotensin II removes kidney resistance conferred by ischemic preconditioning. Biomed Res Int 2014;2014:602149.

7. Korkmaz A, Kolankaya D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury. Can J Surg 2013;56(1):6-14.

8. Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. J Surg Res 2005;129(2):236-41.

9. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. Kidney Int 2002;61(3):862-71.

10. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. J Clin Invest 1996;97(8):1916-23.

11. Ivanov M, Mihailovic-Stanojevic N, Grujic Milanovic J, Jovovic D, Markovic-Lipkovski J, Cirovic S, et al. Losartan improved antioxidant defense, renal function and structure of postischemic hypertensive kidney. PloS one 2014;9(5):e96353.

12. Barrilli A, Molinas S, Petrini G, Menacho M, Elias MM. Losartan reverses fibrotic changes in cortical renal tissue induced by ischemia or ischemia-reperfusion without changes in renal function. Mol Cell Biochem 2004;260(1-2):161-70.

13. Srisawat U, Kongrat S, Muanprasat C, Chatsudthipong V. Losartan and sodium nitroprusside effectively protect against renal impairments after ischemia and reperfusion in rats. Biol Pharm Bull 2015;38(5):753-62.

14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

15. A RN, Ebenezer PJ, Saini Y, Francis J. Angiotensin II-induced hypertensive renal inflammation is mediated through HMGB1-TLR4 signaling in rat tubulo-epithelial cells. Exp Cell Res 2015 15;335(2):238-47.

16. del Moral RM, Gomez-Morales M, Hernandez-Cortes P, Aguilar D, Caballero T, Aneiros-Fernandez J, et al. PARP inhibition attenuates histopathological lesion in ischemia/reperfusion renal mouse model after cold prolonged ischemia. Sci World J 2013;2013:486574.

17. Dokuyucu R, Gogebakan B, Yumrutas O, Bozgeyik I, Gokce H, Demir T. Expressions of TRPM6 and TRPM7 and histopathological evaluation of tissues in ischemia reperfusion performed rats. Ren Fail 2014;36(6):932-6.

18. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, et al. Angiotensin II: A key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. Nephrol Dial Transplant 2006;21(1):16-20.

19. Takeuchi K. Signal transduction systems of angiotensin II receptors. Nihon Rinsho 1999;57(5):1070-7.

20. Shirai A, Yamazaki O, Horita S, Nakamura M, Satoh N, Yamada H, et al. Angiotensin II dose-dependently stimulates human renal proximal tubule transport by the nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate pathway. J Am Soc Nephrol 2014;25(7):1523-32.

21. Vinas JL, Sola A, Hotter G. Mitochondrial NOS upregulation during renal I/R causes apoptosis in a peroxynitrite-dependent manner. Kidney Int 2006;69(8):1403-9.

22. Kinaci MK, Erkasap N, Kucuk A, Koken T, Tosun M. Effects of quercetin on apoptosis, NF-kappaB and NOS gene expression in renal ischemia/reperfusion injury. Exp Ther Med 2012;3(2):249-54.

The Effect of Losartan (AT1 Receptor Inhibitor) on Reactive Nitrogen Species and Renal Function after Renal Ischemia-reperfusion in Rat

Saeide Baarforoush[1], Mohammad Taghi Mohammadi[2*], Javad Raouf Sarshori[2]

[1]*Faculty of Basic Sciences, Payame Noor University of East Tehran, Tehran, Iran.*

[2]*Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Mohammad Taghi Mohammadi,** Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email: mohammadimohammadt@bmsu.ac.ir

Received: 30 Jun, 2015

Accepted: 17 Aug, 2015

Abstract

Background and Objectives: Activation of AT1 receptor (type 1 angiotensin II receptor) has an important role in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injuries. In the present study, the effect of losartan on the level of reactive nitrogen species (RNS) and renal function in renal ischemia-reperfusion injuries, was assessed in rat.

Methods: Eighteen male Wistar rats were randomly divided into three groups of sham, control ischemic, and ischemic treated. Ischemia was induced by occlusion of renal arteries for 60 min. Losartan (10mg/kg) were injected intraperitoneally one hour before ischemia, and also 24, 48, and 72 hours after ischemia. Blood samples were collected for measuring creatinine before and 72 hours after ischemia. Finally, NOx concentration and histopathological changes were assessed 72 hours after ischemia.

Results: The mean of creatinine concentration in the animals in sham and control ischemic groups at the beginning of experiment were 0.37±0.21 and 0.27±0.14mg/dl, respectively. Induction of ischemia significantly increased creatinine concentration (2.75±2.26mg/dl) in the control ischemic group ($p=0.020$). The NOx concentration significantly increased in control ischemic group (29.49±5.93nmol/mg protein) compared to sham group (1.00±0.23nmol/mg protein), ($p<0.001$). Losartan significantly decreased the concentration of creatinine (0.68±0.52mg/dl) in the ischemic treated group ($p=0.044$), and considerably decreased the NOx level in ischemic treated animals along with histhopathological altrations (53%).

Conclusion: The use of losartan can effectively prevent renal ischemia-reperfusion injuries through reduction of RNS and improve the function of the ischemic kidney.

Keywords: Ischemia-reperfusion; Losartan; Angiotensin-II; Reactive nitrogen species.