پژوهنده (مجله پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي شهيد بهشتي)
سال سيزدهم, شماره ۲ , پي در پي ۶۲ ، صفحات ۱۳۵ تا ۱۴۱
خرداد و تير ۱۳۸۷

تاريخ دريافت مقاله ۸۶/۵/۲۲
تاريخ تجديد نظر ۸۶/۱۰/۹
تاريخ پذيرش مقاله ۸۶/۱۰/۲۹

مهار اختصاصی و غیراختصاصی نیتریک اکساید سنتاز در مدل **in vivo** نارسایی کلیوی ناشی از جنتامایسین در موش صحرایي

رعنا غزنوی[1] *، دکتر مهری کدخدایي[2]

چکیده

سابقه و هدف: *در بخش های مختلف کلیه هر سه ایزوفرم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) موجود می باشد. شواهدی دال بر اثرات سودمند فعالیت NOS اندوتلیالی (eNOS) پس ازبرخی انواع آسیب های بافتی وجود دارد و به همین دلیل مهار کامل NOS در این شرایط موجب بدتر شدن عملکرد اعضا می شود. از سوی دیگر پیشنهاد شده که فعال شدن NOS القایی (iNOS) آسیب را تشدید و در نتیجه مهار آن ایجاد بهبودی می کند. در مطالعه حاضر احتمال سودمندی مهار iNOS در مقایسه با مهار عمومی NOS درنارسایی کلیوی ناشی از جنتامایسین بررسی شده است.*

مواد و روش ها: *موش های صحرایی نر در چهار گروه مورد بررسی قرار گرفتند: در گروه شاهد نرمال سالین تزریق شد. در گروه ۲ جنتامایسین (iv ، ٤میلي گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تزریق شد. در گروه ۳ جنتامایسین و سه نوبت L-NIL (L-N6-(1-Imino ethyl) lysine) ۳، iv میلي گرم بر کیلوگرم وزن) تزریق شد. در گروه ٤ جنتامایسین وسه نوبت L-NAME (N-nitro-L- Arginine Methyl Ester) ۱۰ , iv میلي گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تزریق شد. در تمامی گروه ها آنزیم ان استیل بتا دی گلوکز آمینیداز (NAG) وکراتینین ادرار، هم چنین کراتینین خون سنجش شد. میزان کلیرانس کراتینین (فیلتراسیون گلومرولي ،GFR) با فرمول استاندارد محاسبه گردید. مقاطع بافتي از کلیه های حیوانات تهیه و با میکروسکوپ نوري بررسی شد.*

یافته ها: *L-NIL از کاهش GFR ناشی از جنتامایسین پیشگیری کرد. فعالیت NAG در ادرار و میزان کراتینین سرم در گروهی که L-NIL دریافت کردند از گروه جنتامایسین پایین تر بود ولی به حد کنترل نرسید. L-NAME کاهش GFR ، افزایش فعالیت NAG در ادرار و افزایش میزان کراتینین سرم ناشی از جنتامایسین را تشدید کرد.*

نتیجه گیري: *مهار اختصاصی iNOS به وسیله L-NIL می تواند باعث پیشگیری و مهار عمومی NOS به وسیله L-NAME می تواند موجب تشدید نارسایی کلیوی ناشی از جنتامایسین شود.*

واژگان کلیدي: *جنتامایسین ، نارسایي کلیوی ، **L-NIL** ، **GFR** ، **NAG***

مقدمه

نیتریک اکساید (NO) یک مولکول گازی است که در سیگنالینگ سلولي، تولید انرژی سلولی، سیستم دفاعی، التهاب و تنظیم گردش خون نقش دارد. در کلیه ها نیتریک اکساید علاوه بر موارد ذکر شده در تنظیم فیدبک توبولی گلومرولی، ناتریورز فشاری، ترشح رنین و نقل و انتقالات آب و الکترولیت شرکت می کند (۱). در مطالعات اخیر مشخص شده که این مولکول در مکانیسم های دخیل در دیابت، مسمومیت حاملگی و نارسایی کلیه نیز نقش دارد (۲).

۱ * . نویسنده مسؤول: کارشناس ارشد ، گروه فیزیولوژی ، دانشگاه علوم پزشکي تهران . آدرس براي مکاتبه: تهران ، خیابان ۱٦ آذر ، دانشگاه علـوم پزشکي تهران
دانشکده پزشکي ، گروه فیزیولوژی . تلفن و دورنما: ٦٦٤١٩٤٨٤ . پست الکترونیک: **rghaznav @ sina.tums.ac.ir**
۲ . استاد ، گروه فیزیولوژی ، دانشگاه علوم پزشکي تهران

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-20]

آنزیم تولید کننده NO یعنی نیتریک اکساید سنتاز (NOS) دارای سه ایزوفرم NOS نرونی (nNOS) ، NOS اندوتلیالی (eNOS) و NOS القایی (iNOS) است. NO تولید شده به وسیله هر سه ایزوفرم در تنظیم فعالیت های کلیوی شرکت می کنند.

تولید بیش از حد NO بوسیله iNOS که توسط سیتوکین ها تحریک می شود، موجب استرس نیتروزاتیو و فعال شدن رادیکال سوپراکسید می شود (۳) که این مسأله احتمالاً در مکانیسم ایجاد فشار خون، صدمه ایسکمی- ري پرفیوژن و نارسایی حاد کلیوی دخیل است (۴). نشان داده شده که در چنین مواردی مهار iNOS عملکرد کلیه ها را بهبود می بخشد.

هدف از مطالعه حاضر، بررسی احتمال مفید بودن مهار iNOS درپیشگیری از نارسایی کلیوی ناشی از جنتامایسین درمدل in vivo در موش های صحرایی و مقایسه اثر مهار غیر انتخابی NOS در این مورد می باشد.

مواد و روش ها

رت های نر از نژاد Sprague-Dawley با وزن ۲۷۰ تا ۳۲۰ گرم در چهار گروه زیر مطالعه شد:

- گروه ۱ (شاهد): نرمال سالین (ip وiv) تزریق شد.
- گروه ۲: جنتامایسین (iv، ٤میلي گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تزریق شد.
- گروه ۳: جنتامایسین و هم چنین سه نوبت L-NIL (L-N6-(1-Imino ethyl) lysine)، ۳ میلي گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت iv قبل از با جنتامایسین، ۳ میلي گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت ip ۲ و ٤ ساعت پس از جنتامایسین) تزریق شد.
- گروه ٤: جنتامایسین و هم چنین سه نوبت L-NAME (N-nitro-L- Arginine Methyl Ester)، ۱۰ میلي گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت iv قبل از جنتامایسین، ۱۰میلي گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت ip ۲ و ٤ ساعت پس از جنتامایسین) تزریق شد.

سپس حیوانات جهت جمع آوری ادرار در قفس متابولیک قرار داده شدند. روز بعد یک نمونه خون از ورید اجوف تحتاني گرفته، سرم آن استخراج گردید. آنزیم های لاکتات دهیدروژناز (LDH) و ان استیل بتا دی گلوکز آمینیداز (NAG)، کراتینین ادرار و کراتینین خون سنجش شد. میزان کلیرانس کراتینین (فیلتراسیون گلومرولي، GFR) با فرمول استاندارد محاسبه گردید. قبل از انجام آزمایشات و روز بعد از آن، قبل از جراحي، فشارخون حیوان با استفاده از کاف دمي و ترنسدیوسر مخصوص power lab اندازه گیري شد. پس از خون گیري، کلیه هاي حیوان خارج و وزن شد و سپس در فرمالین ۱۰% فیکس و در پارافین قالب گیري گردید. از این کلیه ها مقاطع بافتي تهیه و با ائوزین و هماتوکسیلین رنگ آمیزي شد. بررسي مقاطع بافتي با میکروسکوپ نوري انجام گردید.

میانگین اعداد به دست آمده از آزمایشات به وسیله ANOVA مقایسه و معنی داری اختلافات توسط تست Tukey ($P<۰/۰۵$) بررسی شد.

یافته ها

GFR در گروه جنتامایسین نسبت به کنترل و گروه L-NIL کاهش پیدا کرد ($P<۰/۰۱$). این شاخص در گروه L-NIL تفاوتي با کنترل نداشت. GFR در گروه L-NAME به طور معني دار از گروه جنتامایسین کم تر بود ($P<۰/۰۵$ ، نمودار ۱).

میزان کراتینین سرم در گروه جنتامایسین نسبت به کنترل به طور معني دار بالاتر ($P<۰/۰۱$) و در گروه L-NIL نسبت به گروه جنتامایسین پایین تر ($P<۰/۰۵$) بود هر چند به حد کنترل نرسید. گروه L-NAME در مقایسه با گروه جنتامایسین کراتینین بالاتري داشت

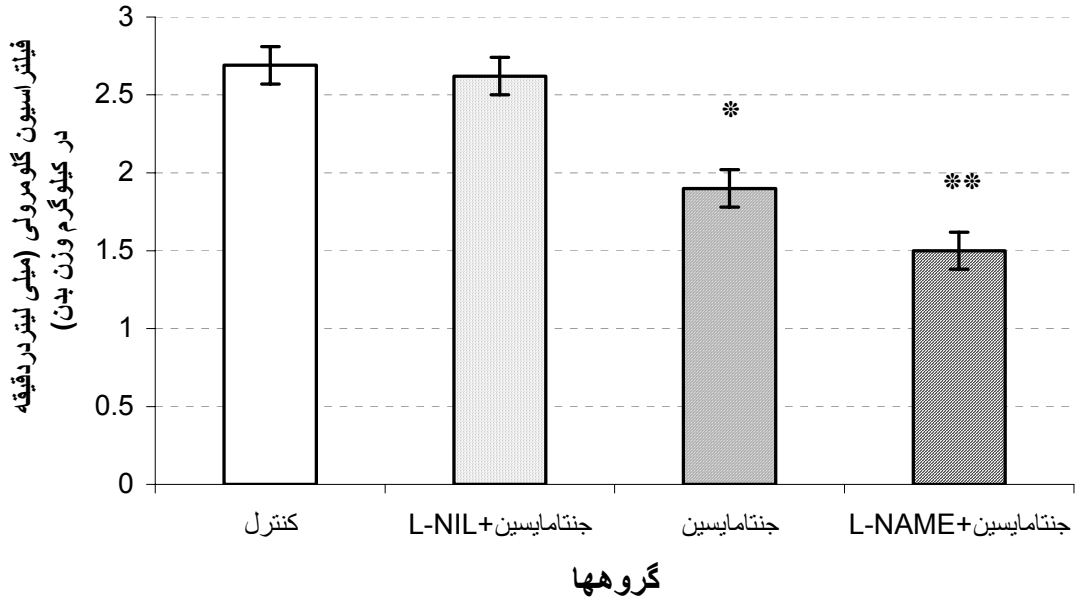
[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-20]

(P<۰/۰۱ ، نمودار۲).

آنزيم NAG در ادرار موش هاي گروه جنتامايسين نسبت به كنترل فعاليت بيش تري نشان داد (P<۰/۰۱) و در گروه L-NIL در حدي مابين كنترل و جنتامايسين قرار داشت. در گروه L-NAME فعاليت اين آنزيم از گروه جنتامايسين بالاتر بود (P<۰/۰۵ ، نمودار۳).

فشار خون در هيچ كدام ازگروه ها به جز گروه L-NAME پس از انجام آزمايشات تغيير معني داري نسبت به ميزان پايه (قبل از انجام آزمايشات) نشان نداد، در حالي كه در گروه مذكور افزايش پيدا كرد (P<۰/۰۰۱ ، نمودار۴).

بررسي هاى ميكروسكوپ نورى برروى مقاطع بافتى مشخص نمود كه كليه هايي كه جنتامايسين دريافت كرده بودند علايمي از آسيب سلولي را بصورت واكوئليزه شدن و انسداد توبول ها نشان دادند (تصوير۱ب). درجات بالاتري از تخريب توبولي در گروه L-NAME + جنتامايسين مشاهده شد (تصوير۱د). در كليه هايي كه L-NIL با جنتامايسين دريافت كرده بودند تمايلي براي محافظت از سلولها و حفظ شكل ظاهري طبيعي بافت وجود داشت (تصوير۱ج). با اين وجود سطح تغييرات ايجاد شده چشم گير نبوده و تفاوت هاى ديده شده در مقاطع مورد بررسى از نظر هيستولوژيک به لحاظ آمارى معنى دار نبود.

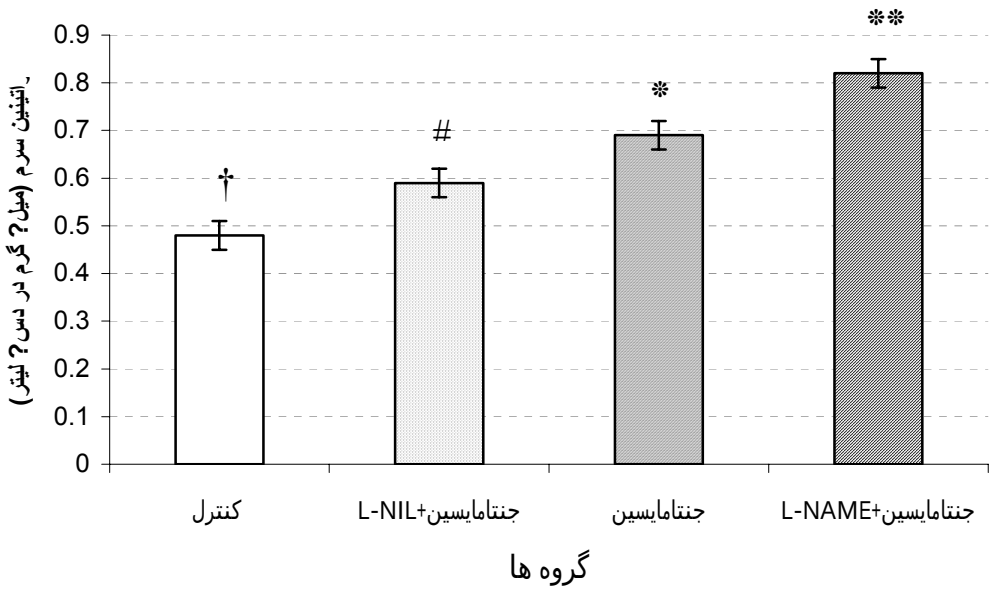


نمودار ۱- مقايسه ميزان فيلتراسيون گلومرولي در گروه هاى مختلف . ميزان فيلتراسيون گلومرولي در گروه جنتامايسين به طور معنى دار با گروه كنترل و L-NIL تفاوت داشت. * p<0.01 در مقايسه با گروه كنترل و L-NIL .

ميزان فيلتراسيون گلومرولي بين دو گروه جنتامايسين وL-NAM E اختلاف معنى دار نشان داد .

** p< 0.05 در مقايسه با گروه جنتامايسين.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-20]



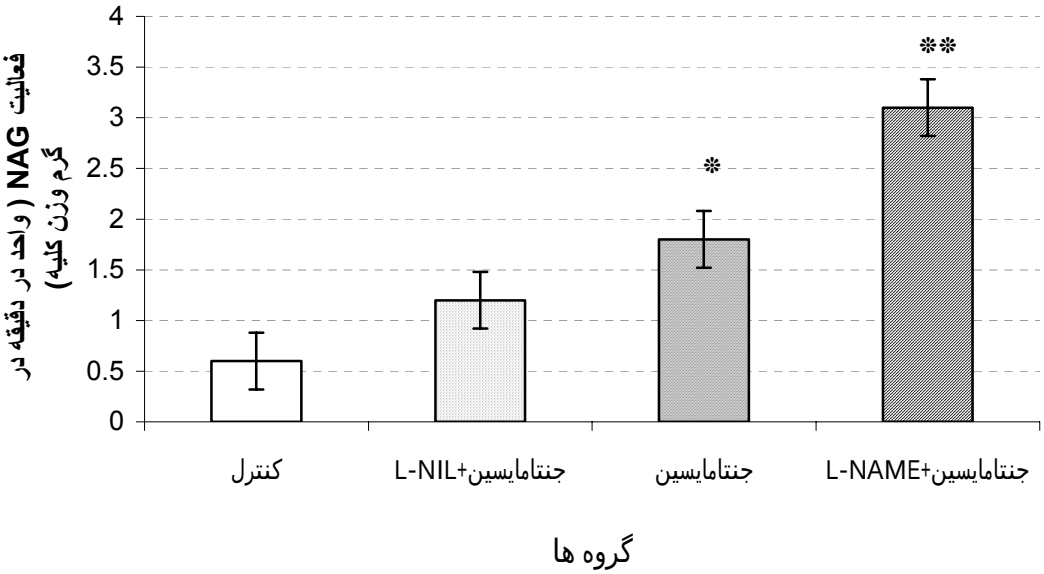
نمودار ۲- مقایسه میزان کراتینین سرم در گروههای مختلف. سطح کراتینین در گروه جنتامایسین بطور معنی دار بالاتر از گروه کنترل بود.

* $P<0.01$ در مقایسه با گروه کنترل. میزان کراتینین گروه جنتامایسین با گروه L-NIL تفاوت معنی دار نشان داد.

# $P<0.05$ در مقایسه با L-NIL. میزان کراتینین گروه L-NIL نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی دار داشت.

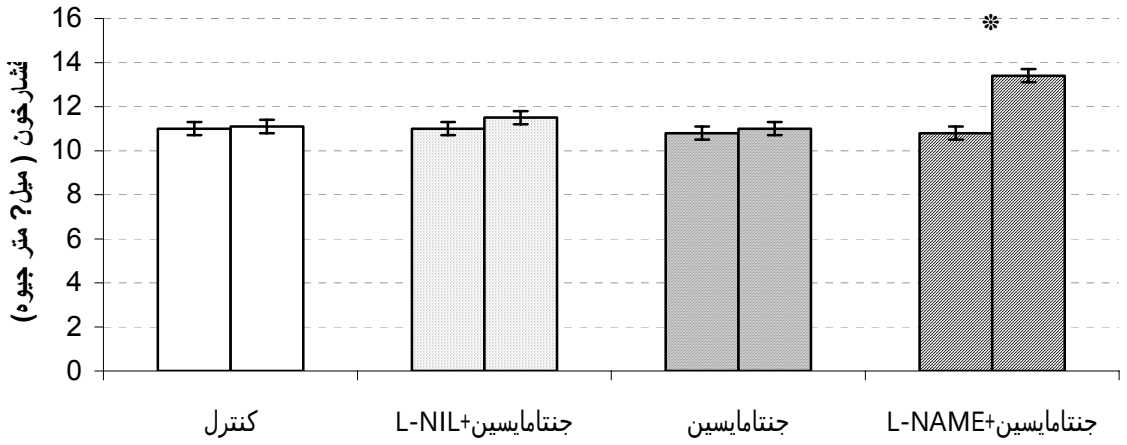
† $P<0.05$ در مقایسه با کنترل. کراتینین گروه L-NAME به طور معنی دار بالاتر از گروه جنتامایسین بود.

** $P< 0.01$ در مقایسه با گروه جنتامایسین.

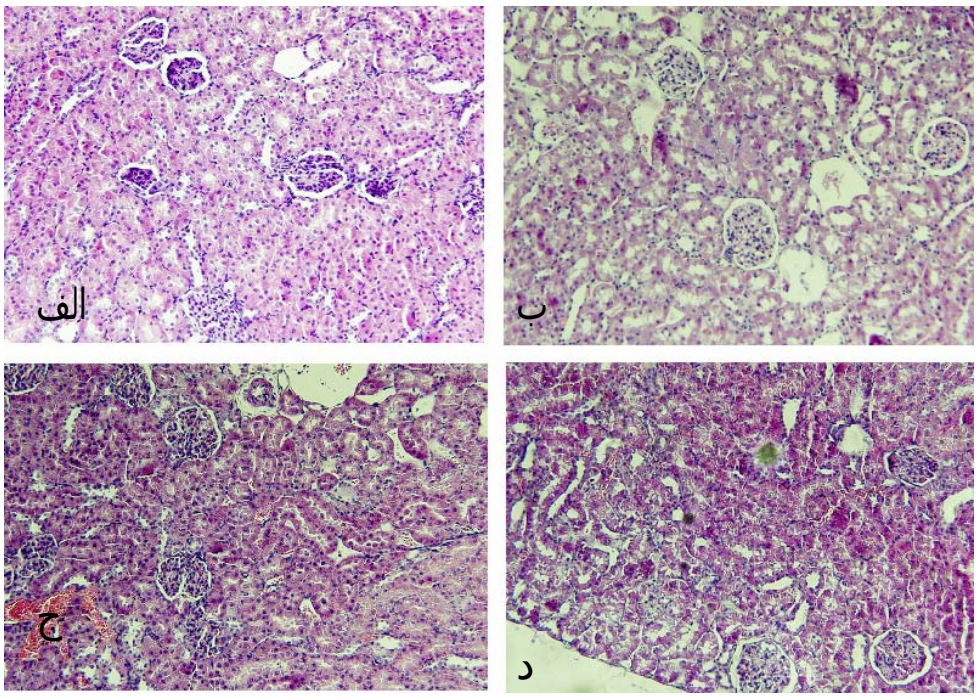


نمودار ۳- مقایسه فعالیت N- استیلb - D- گلوکزامینیداز(NAG) ادرار در گروه های مختلف. فعالیت آنزیم در گروه جنتامایسین به طور معنی دار بالاتر از گروه کنترل بود. * $P<0.01$ در مقایسه با کنترل. فعالیت آنزیم بین گروه L-NAME و جنتامایسین اختلاف معنی دار نشان داد. ** $P< 0.05$ در مقایسه با گروه جنتامایسین

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-20]



نمودار ۴- مقایسه فشار خون ما بین گروه های مختلف و در هر گروه بین قبل از آزمایش و بعد از آزمایش. فشار خون در بعد از آزمایش در گروه L-NAME نسبت به سه گروه دیگر و هم چنین نسبت به همان گروه در قبل از آزمایش به طور معنی دار بالاتر بود. * $P< 0.001$ در مقایسه با سه گروه دیگر و نسبت به همان گروه در قبل ازآزمایش



تصوير ۱- بررسي هيستولوژيك مقاطع بافتي كليه در گروه هاي مختلف. الف- هيستولوژي بافت كليوي طبيعي در گروه كنترل ديده مي شود. ب- در بافت شناسي كليه هاي گروه جنتامايسين آسيب توبولي خفيف شامل درجاتي از واكوئوله شدن وانسداد توبول ها مشاهده مي گردد. ج- دربافت شناسي كليه هاي حيواناتي كه همراه جنتامايسين L-NIL دريافت كردند تمايلي براي حفظ حالت طبيعي سلول ها وجود دارد. د- كليه های گروه چهار كه هم زمان جنتامايسين و L-NAME دريافت كردند درجات شديدتری از صدمات توبولی نسبت به گروه جنتامايسين نشان مي دهند.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-20]

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که L-NIL از کاهش GFR ناشی از جنتامایسین جلوگیری نموده و از افزایش کراتینین و فعالیت NAG به طور نسبی پیشگیری می کند، در حالي که تجویز L-NAME آسیب کلیوی را با توجه به کلیه شاخص های ذکر شده تشدید می نماید.

نشـان داده شـده است که هر سـه ایزوفرم NOS در کلیه ها موجود است، به طوري که ۹۵% eNOS در اندوتلیوم متمرکز شده است. اندوتلیوم و عضله صاف دیواره رگ ها iNOS هم تولید می کنند. iNOS وeNOS در بخش ابتدایی شریانچه وابران و مویرگ های گلومـرولی نیـز یافت می شود که نقش مهمی در تنظیم جریان خون کلیوی دارند.iNOS به ویژه در سلول های مزانژیال تولید می گردد. در تـوبـول های کلیـوی تمـام ایزوفـرم های NOS حضـور دارند (۵).

مطالعات جدید تر این مسأله را مطرح کرده است که فعالیت eNOS باعث بهبود عملکرد کلیه ها پس از صدمات مختلف یا پیشگیری از وقوع این صدمات می شود. به عنوان مثال تولید NO به وسیله eNOS در آماده سازی بافتی قبل از ایسکمی (۶) و افزایش بقای بافت پیوندی (۷) نقش دارد. هم چنین یکی از دلایل مشکلات کلیوی در بیماران دیابتی کاهش فعالیت eNOS در گلومرول هاست (۸). از سوی دیگر نشان داده شده که در انواع مختلف صدمات کلیوی فعال شدن iNOS که منجر به تولید دوزهای بسیار بالایNO می شـود موجـب سیتـو توکسیسیتی توبولی و نارسایی کلیه می شود. در یک مطالعه گزارش شده است که در ایسکمی کلیوی افزایش فعالیت iNOS وجود دارد (۹). در افراد با نارسایی کلیوی ناشی از هموسیستئین بالا تولید NO به وسیله iNOS بیش تراز حد عادی می باشد (۱۰). عنوان شده است که NO تولید شده به وسیله INOS، به علت مهار جانبی eNOS موجب این اثرات سمی می شود (۱۱). به این ترتیب در برخی انواع نارسایی کلیوی مهارiNOS می تواند اثرات سودمندی داشته باشد. به عنوان مثال ذکر شده که مهار انتخابی iNOS از کاهش GFR ناشی از LPS پیشگیری کرده (۱۲) و کارکرد کلیوی را در حیوانات سیروتیک بهبود می بخشد (۱۳).

ریواس کابانرو وهمکاران پیشنهاد کرده اند که در ARF ناشی از جنتامایسین نیز بیان ژن iNOS در گلومرول (۱۴) و سلـول های مـزانژیال (۱۵) افـزایـش می یابد. بنـابرایـن، احتمال دارد که مهار انتخابیiNOS دراین مورد اثرات محافظتی داشته باشد. نتایج پژوهش حاضر از این احتمال حمایت می کند.

در مطالعه حاضر مشاهده شد که تجویز L-NAME عملکرد کلیوی را در نارسایي ناشی از جنتامایسین تشدید می کند. برخی از پژوهشگران نیز گزارشات مشابهی دارند (۱۶و۱۷). پیشنهاد شده که هنگام مهار تمامی ایزوفرم های NOS به وسـیله یک مـهار کننـده غیرانتـخابی مثـل L-NAME ، پیامدهای مضر مهار eNOS بر اثرات مفید مهار iNOS غلبه مي کند (۱۶).

نتیجه گیري

مهار انتخابی iNOS بوسیله L-NIL احتمالاً از نارسایي کلیوی ناشی از جنتامایسین پیشگیری می کند در حـالي که مهـار غیـر انتـخابی NOS به وسیـله L-NAME آن را تشدید می نماید.

REFERENCES

1. Kone BC. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis and functions in health. Nephrol 2004; 24(4): 299-315.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-20]

2. Herrera M, Garvin JL. Recent advances in regulation of nitric oxide in the kidney. Hypertension 2005;45(6): 1062-7.

3. Andre M, Latado H, Felley-Bosco E. Inducible nitric oxide synthase-dependent stimulation of PKGI and phosphorilation of VASP in human embryonic kidney cells. Biochem Pharmacol 2005; 69(4): 595-602.

4. Kumar U, Chen J, Sapoznikhov V. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in the kidney of the spontaneously hypertensive rat. Clin Exp Hypertens 2005; 27(1): 17-31.

5. Goligorsky MS, Gross SS. Nitric oxide and the kidney. New York: Chapman & Hall .1997.

6. Yamasowa H, Shimizu S, Inoue T. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. J Pharmacol Exp Ther 2005; 312(1): 153-9.

7. Tolle M, Levkau B, Keul P. Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. Circ Res 2005; 96(8): 913-20.

8. Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 288(6): F1144-52.

9. Kielar ML, Jeyarajah DR, Zhou XJ. Docosahexaenoic acid ameliorates murine ischemic acute renal failure and prevents increases in mRNA abundance for both TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase. J Am Soc Nephrol 2003; 14(2): 389-96.

10. Zhang F, Siow YL. Hyperhomocysteinemia activates NF-kappaB and inducible nitric oxide synthase in the kidney. Kidney Int 2004; 65(4): 1327-38.

11. Gabbai FB. Effects of nitric oxide synthasis blockers on renal function. Nephrol Dial Transplant 2001; suppl 1(16): 10-3.

12. Schwartz D, Brasowski E, Raskin Y. The outcome of non-selective vs selective nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide treated rats. J Nephrol 2001; 14(2): 110-4.

13. Islas-Carbajal MC, Covarrubias A, Grijalva G. Nitric oxide synthases inhibition results in renal failure improvement in cirrhotic rats. Liver Int 2005; 25(1): 131-40.

14. Rivas-Cabanero L, Lopez Nova M, Montero A. Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin induced renal failure. Eur J Pharmacol 1994; 270(1): 119-21.

15. Rivas-Cabanero L, Rodriguez A, Lopez Nova M. Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. Exp Nephrol 1997; 5(1): 23-30.

16. Cenk C, Sen S, Boztok N. Proctective effects of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. Eur J Pharmacol 2000; 390: 327-34.

17. Rivas-Cabanero L, Rodriguez-Barbero A, Arevalo M. Effect of NG-nitro-L-arginine methyl ester on nephrotoxicity induced by gentamicin in rats. Nephron 1995; 71(2): 203-7.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2024-04-20]