اثر محافظتی اِل-آرژنین (پیش ساز NO) بر نفروتوکسیسیتی ناشی از آهن در موشهای صحرایی

علی گل .M.Sc☆♦، مهری کدخدایی .M.Sc☆، منصورکشاورز .Ph.D☆، سیمین آریامنش .Ph.D☆
نسرین مکی .B.Sc★، صدیقه شمس .M.D★

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه فیزیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز طبی کودکان

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۷۳۱۳-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه فیزیولوژی

چکیده

* **هدف:** بررسی تعامل بین آهن و نیتریک اکساید (NO) در عملکرد کلیوی موش صحرایی

* **مواد و روشها:** بدین منظور از آهن دکستران (Fe)، L-arginine (L-arg)، پیش ساز NO و L-NAME (مهار کنندهٔ تولید NO) استفاده شد و غلظت سرمی کراتینین به عنوان شاخص وضعیت کلیوی اندازه گیری شد. حیوانات مورد آزمایش به پنج گروه هشت تایی زیر تقسیم شدند: Sham (دریافت محلول نمکی به صورت داخل صفاقی ip)، Fe (۶۰۰ mg/kg ip)، L-arg (۴۰۰mg/kg ip در دو دوز تقسیم شده)، Fe+L-arg، Fe+L-NAME (L-NAME با دوز ۸۰mg/kg ip در دو دوز تقسیم شده). بیست ساعت پس از تزریقات غلظت سرمی کراتینین تعیین شد.

* **یافته‌ها:** پس از آنالیز آماری (ANOVA یکطرفه و پس‌آزمون Newman Keul's) نتایج زیر حاصل شد. غلظت کراتینین در گروه Fe نسبت به گروه‌های L-arg و Sham افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) را نشان داد. در گروه Fe+L-NAME این میزان نسبت به گروههای Sham و L-arg و Fe+L-arg افزایش معنی‌داری در سطح $P<0.01$ را نشان می‌دهد و در گروه Fe+L-arg نسبت به گروه Fe کاهش نشان داده ولی نسبت به گروه‌های L-arg و Sham تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

* **نتیجه‌گیری:** یافته‌های این مطالعه پیشنهاد می‌کنند که تولید NO اثر محافظتی در برابر اثرهای توکسیک آهن دارد و مهار تولید آن بر شدت نفروتوکسیسیتی ناشی از آهن می‌افزاید.

گل واژگان: آهن، اِل -آرژنین، کراتینین، کلیه

مقدمه

امروزه استرس اکسیداتیو به عنوان عامل به وجود آورنده یا مرتبط با تعداد زیادی از بیماریها مطرح است که از آن جمله می‌توان ازآلزایمر (۱) گلومرولواسکلروز (۲) و سرطان (۳) نام برد.

استرس اکسیداتیو می‌تواند توسط افزایش تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن ایجاد شود زیرا این رادیکالها به دلیل فعالیت شیمیایی بالا میتوانند با چربیها (۴)، DNA (۵)، و پروتئینها (۶) واکنش نشان داده و در نهایت تغییر ساختار و عملکرد آنها را موجب شوند.

آهن آزاد به دلیل نقش شناخته شده‌ای که در ایجاد رادیکال هیدروکسیل به عنوان فعالترین و مخربترین رادیکال آزاد اکسیژن دارد از عوامل مؤثر در ایجاد استرس اکسیداتیو به شمار می‌آید (۳). با تزریق Fe-NTA به موشهای صحرایی آثار نفروتوکسیسیتی در آنها مشاهده شده و میزان اوره و کراتینین سرمی افزایش یافت (۷، ۸). در افراد دیابتیک مبتلا به تالاسمی به دلیل افزایش محتوای آهن بدن ناشی از انتقال خون، آثار نفروپاتی در مقایسه با افراد دیابتیک بیشتر است که نشانگر اثر اکسیداتیو آهن است زیرا محصولات ناشی از این نوع از استرس مانند Malondialdehyde افزایش می‌یابد (۹).

از طرف دیگر؛ نیتریک اکساید (NO) در غلظتهای بالا می‌تواند به تنهایی (۱۰، ۱۱، ۱۲) سیتوتوکسیک بوده یا در ترکیب با برخی از رادیکالهای آزاد اکسیژن تولید پراکسی نیتریت نموده و از این طریق آثار مخرب سلولی را ظاهر نماید. Zhang در سال ۲۰۰۰ با افزایش تولید NO توسط تزریق لیپوپلی ساکارید آثار نفروتوکسیک را در موش صحرایی مشاهده نمود (۱۳). آهن و NO در تنظیم غلظت یکدیگر نقش داشته (۱۴) و با یکدیگر تعامل دارند اما در مورد نتایج این تعامل اتفاق نظر وجود ندارد زیرا در سلولهای کشت داده شدهٔ کلیوی آهن فعالیت نیتریک اکساید سنتاز را افزایش داده و از این طریق میزان آسیب را افزایش می‌دهد (۱۵)، حال آنکه در سلولهای کشت داده شدهٔ کبدی NO ناشی از تزریق لیپوپلی ساکارید به عنوان عامل دفاعی در برابر اثرهای مخرب آهن عمل می‌کند (۱۶).

هدف از مطالعه حاضربررسی تعامل بین آهن و L-arg به عنوان پیش ساز NO بر عملکرد کلیوی موش صحرایی در محیط *In vivo* است.

مواد و روشها

* داروها

آهن دکستران (Fe)، و L-NAME از شرکت Sigma و L-arginine (L-arg) از شرکت Merck خریداری شدند.

* گروههای آزمون

در این آزمایشها از موشهای صحرایی از نژاد اسپراگ داولی استفاده شد. حیوانات به مدت ۷ روز برای تطابق با محیط حیوانخانه در دمای ۲۴-۲۲ سانتی گراد نگهداری شدند.

موشهای صحرایی به گروههای هشت تایی زیر تقسیم شدند:

۱) گروه Sham: دریافت نرمال سالین

۲) گروه Fe: دریافت آهن دکستران به میزان ۶۰۰ mg/kg (۱۷)

۳) گروه L-arg: دریافت L-arginine به میزان ۴۰۰ mg/kg (۱۸) در دو دوز تقسیم شده

۴) گروه Fe+L-arg: دریافت L-arg ۰/۵ ساعت قبل و ۸ ساعت پس از تزریق آهن دکستران

۵) گروه Fe+L-NAME: دریافت L-NAME به میزان ۸۰ mg/kg (۱۹) در دو دوز تقسیم شده، ۰/۵ ساعت قبل و ۸ ساعت پس از تزریق آهن دکستران.

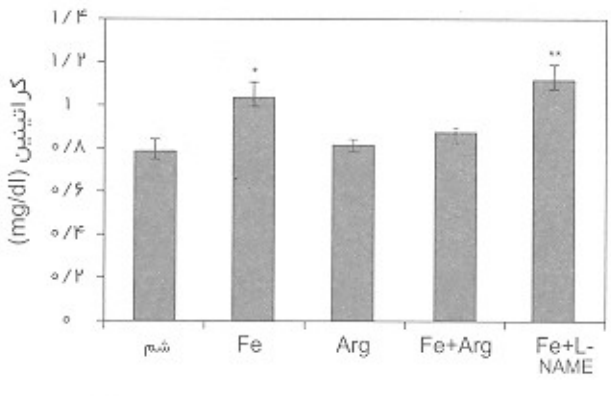
تمامی تزریقات به صورت داخل صفاقی صورت گرفت. پس از گذشت ۲۰ ساعت از تزریقات، حیوانات ابتدا با تزریق داخل صفاقی کتامین با دوز ۷۰ mg/kg بیهوش شدند و سپس باایجاد برشی در ناحیهٔ شکم و آشکار ساختن ورید اجوف تحتانی نمونهٔ خونی برای تعیین غلظت کراتینین سرم تهیه شد. نمونه‌هارا پس از انعقاد خون سانتریفوژ نموده و سرم حاصل در دمای ۲۰- سانتیگراد تا زمان سنجش نگهداری شد. غلظت کراتینین به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه هیتاچی ۷۰۴ اندازه‌گیری شد.

* تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شده‌اند. برای بررسی آماری از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و پس از آن از تست Student Newman Keul's استفاده شده و $P<0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نمودار ۱ میانگین غلظت کراتینین سرم ± خطای معیار را در گروههای مختلف نشان می‌دهد. در گروه L-arg اختلاف معنی‌داری با گروه Sham مشاهده نمی‌شود حال آنکه میانگین غلظت کراتینین در گروه Fe به طور معنی‌داری نسبت به گروههای Sham و L-arg افزایش یافته است ($P<0.05$).



نمودار ۱: مقایسهٔ میانگین ± خطای معیار غلظت کراتینین سرم در گروههای مختلف

* اختلاف معنی‌دار $P<0.05$ با گروههای Sham و L-arg

** اختلاف معنی‌دار $P<0.01$ با گروههای Sham و L-arg Fe+L-arg

Fe=Iron dextran, L-arg=L-arginine

بین گروه Fe+L-arg باگروههای Sham و L-arg و Fe اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. در گروه Fe+L-NAME میانگین غلظت کراتینین نسبت به تمامی گروهها بالاتر می‌باشد به طوری که باگروههای Sham و L-arg و Fe+L-arg در سطح $P<0.01$ معنی‌دار است ولی تفاوت معنی‌داری را باگروه Fe نشان نمی‌دهد.

بحث

در این مطالعه تزریق آهن با دوز مورد استفاده اثر سمی بر کلیه داشته به نحوی که غلظت کراتینین سرم را افزایش داده است و تزریق L-NAME با مهار سنتز NO اثرهای سمی آهن را تشدید نموده و نیز تزریق L-arg اثر مهاری بر این سمیت داشته است و همان گونه که در نمودار ۱ نیز نشان داده شده اختلاف معنی‌داری بین گروه Fe+L-arg با L-arg و Sham مشاهده شد.

مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو عامل مهمی در پاتوژنز آسیب کلیوی است. یکی از شاخصهای آسیب کلیوی افزایش غلظت سرمی کراتینین است.

عوامل متعددی می‌توانند با ایجاد استرس اکسیداتیو موجب صدمات کلیوی به ویژه در توبول پروگزیمال شوند. نشان داده شده است که بروماتِ پتاسیم با تولید رادیکال هیدروکسیل موجب صدمهٔ کلیوی شد و غلظت کراتینین سرمی رادر موش صحرایی افزایش داده است (۲۰). استرس اکسیداتیو میتواند در نتیجهٔ اکسیژناسیون مجدد پس از ایسکمی و هیپوکسی (۱۲، ۲۱، ۲۲)، تجویز جیوه (۲۳)، لیپوپلی ساکارید (۱۳، ۲۴) و آهن (۱۷، ۲۵، ۲۶) آسیب کلیوی ایجاد کند.

توجه زیادی به نقش بالقوه آهن در پاتوژنز آسیب حاد و مزمن کلیوی وجود دارد. برای مثال آهن ممکن است که یک فاکتور پاتوژنیک به هنگامی که کلیه در معرض هموگلوبین یا میوگلوبین قرار می‌گیرد در حیوانات با صدمات کلیوی باشد.

آهن توسط واکنش Fenton تولید رادیکال هیدروکسیل می‌نماید که توانایی ایجاد آسیب به غشاء سلول، پروتئین و DNA را دارا است. اثر توکسیک آهن بر کلیه و افزایش غلظت سرمی کراتینین به هنگامی که از Ferric nitrilo triacetate (Fe-NTA) در موشهای صحرایی استفاده شد نیز مشاهده شده است (۷، ۸). آهن حتی در دوزهای درمانی نیز می‌تواند اثرهای اکسیداتیو خود را اعمال نماید به طوری که در بیماران دیالیزی تزریق تک دوز ترکیب آهن دار به هنگام دیالیز معیار پراکسیداسیون چربیها را افزایش داده است (۲۷). در تحقیق حاضر اثر حاد تزریق آهن دکستران مطالعه گردید و ملاحظه شد که غلظت کراتینین افزایش یافته است. Zhou در سال ۲۰۰۰ تنها با یک بار تزریق آهن دکستران به میزان ۵۰۰ mg/kg و بررسی اثر آن پس از بیست هفته مشاهده نمود که که پاک سازی کراتینین نسبت به گروه کنترل کمتر است؛ اگر چه معنی‌دار نبوده است (۲۸). احتمال دارد که پس از گذشت بیست هفته مقداری ترمیم در کلیه‌ها صورت گرفته باشد.

بعضی از تحقیقات افزایش تولید NO را عامل مهمی در ایجاد آسیب اکسیداتیو کلیوی می‌دانند (۱۳، ۲۴) البته در این تحقیقات از عوامل محرک آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) مانند لیپو پلی ساکارید استفاده شده است که علاوه بر تولید NO، باعث افزایش تولید آنیون سوپراکسید می‌شود و این دو در ترکیب با هم تولید پراکسی‌نیتریت می‌نمایند که عامل اکسیدان قوی بوده و آسیب کلیوی ایجاد می‌نماید در حالی که در مطالعه حاضر از پیش ساز NO (L-arg) استفاده شده است و در مقایسه با گروه Sham تفاوتی در غلظت کراتینین مشاهده نشد. Chen هم در سال ۱۹۹۸ نیز در سلولهای کشت داده شدهٔ کلیوی به هنگامی که از L-arg استفاده نمود آثار سمی مشاهده نکرد (۱۵).

در مورد تعامل بین NO و آهن پاسخ به دو صورت مشاهده شده است. از یک طرف در سلولهای کشت داده شدهٔ کلیوی آهن تولید NO را افزایش داد و قدری از آسیب خود را از طریق NO اعمال نمود و مهارگر تولید NO توانست مقداری از آسیب ناشی از آهن راکاهش دهد (۱۵) که با نتایج مطالعه حاضر سازگار نیست. شاید یکی از دلایل این اختلاف نحوهٔ آزمایش باشد زیرا مطالعهٔ ما به صورت *In vivo* بوده است. از طرف دیگر در بسیاری از مطالعات در مورد تعامل بین NO و آهن نشان داده شده است که NO نقش مهاری را در آسیب ناشی از آهن از خود نشان می‌دهد. به عنوان مثال در سلولهای کشت داده شدهٔ کبدی NO تولید شده توسط تزریق لیپوپلی ساکارید توانسته است با آثار سیتوتوکسیک آهن مقابله کند و مهار تولید آن اثرهای سمی آهن را تشدید کرده است (۱۶) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. از موارد دیگر می‌توان نقش آنتی اکسیدانی NO را در برابر استرس ناشی از آهن در مغز به هنگامی که از دهنده‌های NO استفاده شد نام برد (۲۹، ۳۰). NO حتی هنگامی که استرس اکسیداتیو ناشی از بروماتِ پتاسیم بوده است، اثر مهاری داشته و کاهش آسیب کلیوی را به دنبال داشته است و استفاده از مهارگر تولید NO (L-NAME) آسیب بیشتری بر کلیه وارد نمود و افزایش بیشتری در غلظت کراتینین را موجب شد (۲۰).

اینکه NO چگونه می‌تواند اثر آنتی اکسیدانی داشته باشد چند مکانیزم پیشنهاد شده است: ۱- تشکیل کمپلکسهای غیر فعال با آهن (۱۶)، ۲- اکسیده کردن فلزات احیا شده که توانایی تولید رادیکال هیدروکسیل را دارند و ۳- خاتمهٔ واکنشهای زنجیره‌ای رادیکال آزاد ناشی از رادیکالهای مشتق از دارو و نمونه‌های رادیکالی آلکیل و آلکیل پراکسیل (۳۱).

از نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان کاربرد بالینی آن را در آیندهٔ نزدیک در افراد با محتوای آهن بالا ذکر کرد زیرا این افراد (بیماران تالاسمی و بیمارانی که مصرف درمانی آهن دارند) در معرض استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش آهن هستند.

به طور خلاصه در این مطالعه آهن باعث افزایش غلظت کراتینین سرم شده است و بلوک سنتز NO اثر سمی آهن را تشدیدنمود و از طرف دیگر با تزریق L-arg از این اثر جلوگیری به‌عمل آمد.

References

1. De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE: Biomarkers of free radical damage; Application in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med 1999; 26: 202-226

2. Ishiyama A, Atrash K, Minami M, Tagi M, Kimura K, Goto A, Omata M: Role of free radicals in the pathogenesis lipid-induced glomerulosclerosis in rats. Kidney Int 1999; 52: 1348-1358

3. Aust AE, Eveleigh JF: Mecanisms of DNA oxidation. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 222: 246-255

4. Steinberg D: Low density lipoprotein oxidation and its patological significance. J Biol Chem 1997; 272: 20963-20966

5. Henle ES, Linn S: Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. J Biol Chem 1997; 272: 19095-19098

6. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies Mj: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J 1997; 324: 1-18

7. Iqbal M, Athar M: Attenuation of iron-nitriolotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. Food Chem Toxicol 1998; 36: 485-495

8. Iqbal M, Rezazadeh H, Ansar S, Athar M: Alpha-tocopherol (Vitamin-E) ameliorates ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-dependent renal proliferative response and toxicity: diminution of oxidative stress. Hum Exp Toxicol 1998; 17: 163-171

9. Loebstein R, Lehotay DC, Luo X, Bratfay W, Tyler B, Sher GD: Diabetic nephropathy in hypertransfused patients with ß-thalassemia.The role of oxidative stress. Diabetes Care 1998; 21: 1306-1309

10. Richter C, Gogvadze V, Schelapbach R, Schweizer M, schlegal J: Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitocondrial calcium. Biochem Biophys Res Comm 1994; 205: 1143-1150

11. Volk T, Ioannidis I, Hensel M, deGroot H, Kox W: Endothelial dammage induced by nitric oxide: Synergism with reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Comm 1994; 213: 169-203

12. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke Tj, Scherier RW: Nitric oxide: A mediator in rat tubular hypxia/reoxygenation injury. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 1691-1695

13. Zhang C, Walker LM, Mayeux PR: Role of nitric oxide in lipopolysacharide-induced oxidant stress in the rat kidney. Biochem Parmacol 2000; 59: 203-209

14. Ponka P: Cellular iron metabolism. Kidney Int Suppl 1999; 69: S2-S11

15. Chen L, Zhang BH, Harris D: Evidence suggesting that nitric oxide mediates iron-induced toxicity in cultured proximal tubule cells. Am J Physiol 1998; 274: F18-F25

16. Sergent O, Griffon B, Morel I, Chevanne M, Dubos MP, Cillard P, Cillard J: Effect of nitric oxide on Iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. Hepatology 1997; 25: 122-127

17. Galleano M, Farre SM, Turrens JF, Puntarulo S: Resistance of rat kidney mitocondrial membranes to oxidation induced by acute iron overload. Toxicology 1994; 88: 141-149

18. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, Kim BM, Tanaka T, Hiai H, Nishimura Y: Involvment of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. Plast Reconstr Surg 1998; 101: 785-792

19. Bosse HM, Bohm R, Resch S, Bachmann S: Parallel regulation of constitutive NO synthase and renin at JGA of rat kidney under various stimuli. Am J Physiol 1995; 269: F793-F805

20. Rahman A, Ahmed S, Khan N, Sultan S, Athar M: Glyceryl trinitrate, a nitric oxide donor, suppresses renal oxidant damage caused by potassium bromate. Redox Rep 1999; 4: 263-265

21. Paller MS, Weber K, Patten, M: Nitric oxide-mediated renal epithelial cell injury during hypoxia and reoxygenation. Ren Fail 1998; 20: 459-469

22. Uysal F, Girgin FK, Tuzun S, Aldemir S, Sozmen EY: Effect of vitamin E on antioxidante enzymes and nitric oxide in ischemia-reperfused kidney injury. Biochem Mol Biol Int 1998; 44: 1255-1263

23. Rumbeiha Wk, Fitzgerald S, Braselton WE, Roth RA, Kaneene JB: Potentiation of mercury-induced nephrotoxicity by endotoxin in the Sprague-Dawley rat. Toxicology 2000; 149: 75-84

24. Traylor LA, Mayeux PR: Nitric oxide generation mediates lipid A-induced oxidant injury in renal proximal tubules. Arch Biochem Biophys 1997; 388: 129-135

25. Dimitriou E, Kairis M, Sarafidou J, Michelakakis M: Iron overload and kidney lysosomes. Biochim Biophys Acta 2000; 1501: 138-148

26. Galleano M, Puntarulo S, Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after

acute iron overload in rats. Biochem Biopyhs Acta 1995; 1271: 321-326
27. Roob JM, Khoschsorur G, Trian A, Horina H, Hozler H, Winkhofer-roob BM: Vitamin E attenuates oxidative stress induced by intravenous iron in patients on hemodialysis. J Am Soc Nephrol 2000; 11: 539-549
28. Zhou XJ, Laszik Z, Wang XQ, Silva FG, Vaziri ND: Association of renal injury with increased oxygen free radical activity and altered nitric oxide metabolism in chronic experimental hemosiderosis. Lab Invest 2000; 80: 1905-1914
29. Van Bergen P, Rauhala P, Spooner CM, Chiueh CC: Hemoglobin and iron-evoked oxidative stress in the brain: Protection by bile pigments, manganese and S-nitrosoglutathione. Free Radic Res 1999; 31: 631-640
3. Rauhala P, Lin AMY, Chiueh CC: Neuroprotection by S-nitrosoglutathione of brain dopamine neurones from oxidative stress. FASEB J 1998; 12: 165-173
31. Mitchell JB, Krishna MC, Kuppusmay P, Cook JA, Russo A: Protection against oxidative stress by nitroxides Proc. Soc Exp Biol Med 2001; 226: 620-621