Physiology and Pharmacology, 17 (3), 254-265

Autumn 2013 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Orexin-A Improves Hepatic Injury Following Renal Ischemia Reperfusion in Rats

Firouzeh Gholampour[1*], Seyed Mohammad Owji[2]

1. Dept. of Biology, School of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Dept. of Pathology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 21 May 2013 **Accepted: 11 Aug 2013**

Abstract

Introduction: Orexins are novel neuropeptides that are localized in neurons in the lateral hypothalamus. They are implicated in a wide variety of physiological functions. Orexin peptides and receptors are found in many peripheral organs such as kidneys. It has been demonstrated that exogenous orexin-A can induce protective effects against ischemia–reperfusion injury in many organs. The goal of this study was to determine the effect of orexin-A on the hepatic dysfunction and histological damage induced by renal ischemia/ reperfusion at an early stage.

Methods: Pentobarbital anaesthetized rats were prepared for measuring renal functional variables. Ischemia was induced by bilateral renal artery clamping for 30 min followed by a 1 h reperfusion period. In orexin-treated rats, it was infused at 500 $pmol \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ (i.v.) from the beginning of pre-ischemic (pretreatment) clearance period. The liver was examined using light microscopy.

Results: The renal ischemic challenge resulted in hepatic functional and histological damages, which were associated with decreased creatinine clearance during the reperfusion period. In orexin-treated rats, the functional and histological damages to the liver were improved along with the decrease in creatinine clearance being smaller than those of the non-treated rats.

Conclusion: Orexin-A exhibited an ameliorative effect against renal ischemia/reperfusion-induced lesions in the liver.

Key words: Orexin -A, ischemia/reperfusion, liver, creatinine, congestion

* Corresponding author e-mail: gholampour@shirazu.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (۳)، ۲۵٤ – ۲٦٥
پاییز ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اورکسین–A آسیب کبدی متعاقب ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیوی را در موش صحرایی بهبود می بخشد

فیروزه غلامپور[1*]، سید محمد اوجی[2]
۱. بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز
۲. بخش پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

دریافت: ۳۱ اردیبهشت ۹۲ پذیرش: ۲۰ مرداد ۹۲

چکیده

مقدمه: اورکسین ها نوروپپتیدهای جدیدی هستند که در نرون های هیپوتالاموس جانبی قرار دارند. آنها در انواع وسیعی از اعمال فیزیولوژیک دخالت دارند. پپتیدهای اورکسین و گیرنده های آن در چندین اندام محیطی همچون کلیه یافت می شوند. نشان داده شده است که اورکسین– A می تواند در مقابل آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد چندین اندام اثرات حفاظتی اعمال کند. هدف از این تحقیق بررسی اثر اورکسین– A بر ناکارآمدی کبد و آسیب بافت کبدی القاء شده توسط ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیه در مراحل اولیه بود.

روش ها: موشهای صحرایی بیهوش شده با پنتوباربیتال سدیم برای اندازه گیری متغیرهای عملکردی کلیه آماده شدند. ایسکمی با بستن دوطرفه شریان کلیوی به مدت نیمساعت ایجاد شد و به دنبال آن یک ساعت خونرسانی مجدد صورت گرفت. در موش های صحرایی تیمار شده با اورکسین– A، دارو به میزان ۵۰۰ پیکومول بر کیلوگرم در دقیقه از شروع دوره کلیرانس نیم ساعت قبل از القاء ایسکمی (پیش درمان) تزریق شد. در پایان نمونه های بافت کبد جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری جدا و تثبیت شدند.

یافته ها: ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیه موجب آسیب های عملکردی و بافتی کبد شد، که با کاهش کلیرانس کراتینین در طی دوره خونرسانی مجدد همراه بودند. در موش های صحرایی تیمار شده با اورکسین–A، آسیب های عملکردی و بافتی کبد بهبود یافت و کاهش کلیرانس کراتینین نسبت به موش های صحرایی تیمار نشده به طور معنی داری کمتر بود.

نتیجه گیری: اورکسین–A در مقابل آسیب های القاء شده توسط ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیوی در کبد اثر بهبودی بخش دارد.

واژه‌های کلیدی: اورکسین–A، ایسکمی/خونرسانی مجدد، کبد، کراتینین، احتقان

مقدمه

اورکسین ها/هیپوکرتین ها نوروپپتیدهای جدیدی هستند که در ساختارهای مغزی، ابتدائاً در هیپوتالاموس جانبی توزیع وسیعی دارند. این پپتیدها در تنظیم اعمال مختلف مغز همچون تغذیه و خواب دخالت دارند [۵، ۳۳]. دو نوع اورکسین وجود دارند که هر دو از یک مولکول پره پرو اورکسین مشتق می شوند: اورکسین–A و اورکسین–B. اورکسین ها دارای دو نوع گیرنده OX1R و OX2R هستند که هر دو به خانواده گیرنده جفت شده با G–پروتئین تعلق دارند [۱۴، ۳۳]. اورکسین–A میل ترکیبی یکسانی برای گیرنده های OX1R و OX2R دارد در حالیکه اورکسین–B برای اتصال به OX2R میل ترکیبی ۱۰ برابری در مقایسه با OX1R دارد [۳۳]. مطالعات اخیر بیان mRNA پره پرو اورکسین و گیرنده های اورکسین را در اندام های محیطی مثل کلیه را

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: gholampour@shirazu.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

ثابت کرده اند [۲۲، ۴۰]. بعلاوه، در انسان و موش صحرایی اورکسین–A در پلاسما تشخیص داده شده است [۱، ۷، ۱۲].

هم کبد و هم کلیه ها در تنظیم پاسخ های هومئوستاتیک، متابولیسم و دفع داروها و فرآورده های سمی دخالت دارند [۳۴]. چندین تحقیق تداخل عمل بین کلیه ها و کبد را نشان داده اند [۱۳، ۳۷]. شواهد زیادی اثرات مضر آسیب حاد کلیوی را بر عملکرد اندام دوردست نشان داده اند که این اثرات، حداقل بخشی از آنها، ناشی از نبود تعادل طبیعی ایمنی، التهاب و متابولیسم میانجی های محلول است که آسیب اپیتلیوم توبولی را در پی دارد. چنین بی نظمی ای، که حداقل بخشی از آن روی اندوتلیوم اثر می کند، اندام دوردست را به مخاطره می افکند [۲۵]. تحقیقات نشان داده اند که میزان بالای مرگ و میر در آسیب حاد کلیوی عمدتاً از اثرات خارج کلیوی آن ناشی می شوند [۱۵، ۲۹]. آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد یک پاسخ التهابی را القاء می کند که باعث تشکیل گونه های واکنش گر اکسیژن می شود و آسیب بافت موضعی را تقویت می کند یا روی اندامی دورتر از مکان ایسکمی/خونرسانی مجدد اثر می گذارد. یکی از اعمال مهم گونه های واکنش گر اکسیژن تنظیم بیان ژن سیتوکین است [۲۸، ۳۱].

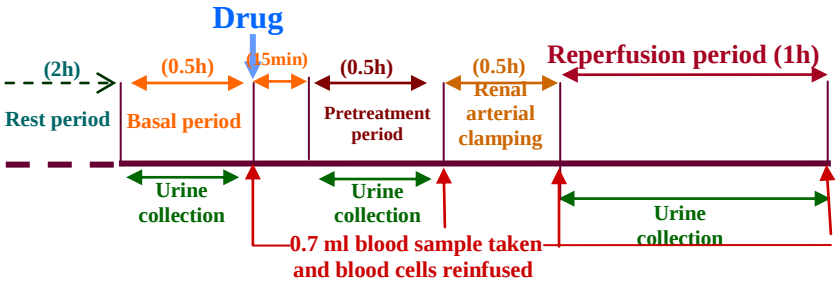
در سال ۲۰۰۲ Miyazawa و همکاران یورش نوتروفیل‌ها و لنفوسیت ها را به، نه تنها کلیه کلمپ شده، بلکه به سینوزوئیدهای کبد همراه با ناکارآمدی کبد نشان دادند. این یافته ها نشان می دهند که یک پاسخ ایمنی سلولی سیستمیک، که سلول های حد واسط T را در بر می گیرد، روی چندین اندام در طی نارسایی حاد کلیوی ایسکمیک (ARF) اثر می گذارد، که در توسعه نارسایی چند اندامی نقش مهمی را ایفا می نماید. از آنجا که بافت کبد دارای یکی از بسترهای عروقی است که گونه های واکنش گر اکسیژن به داخل آن می رسند، می تواند بعضی از اثرات سمی این مولکول ها را ظاهر سازد. نشان داده شده است که اورکسین–A روی دفاع آنتی اکسیدان برعلیه آسیب معدی القاء شده توسط ایسکمی/خونرسانی مجدد معده در موشهای صحرایی، با پایین آوردن لیپید پراکسیداسیون، اثر مفیدی دارد [۲۱].

Kielar و همکاران تنظیم خارج کلیوی نارسایی حاد کلیوی را ارزیابی کرده اند [۱۶]. این تنظیم ممکن است حاصل از افزایش تولید سیتوکین هایی همچون فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) و فاکتورهای رشدی همچون فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF) تولید شده توسط اندام های خارج کلیوی باشد [۲۴]. بعلاوه، ایسکمی کلیه باعث افزایش بیان mRNA اینترلوکین–۶ [۱۸]، تولید کلیوی اینترلوکین–۶، و بیان گیرنده های اینترلوکین–۶ می گردد. اینترلوکین–۶ تولید اینترلوکین–۱۰ توسط کبد را تحریک می کند، که ممکن است آسیب کلیوی را بهتر کند [۱۳].

حال سوالی که مطرح است این می باشد که آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیه (۳۰ دقیقه/۱ ساعت) تا چه حدودی بر روی کبد اثر می گذارد. از طرف دیگر، بعضی از محققین دخالت اورکسین– A در پاسخدهی به شرایط ایسکمیک را نشان داده اند. Dohi و همکاران ثابت کردند که سطح اورکسین– A در مایع مغزی نخاعی بیمارانی که دچار خونریزی ساب آراکنوئید شده‌اند پایین تر از حد طبیعی است [۸]. در حالیکه Lin و همکاران در مدل ایسکمی/خونرسانی مجدد روده نشان دادند که سطح پروتئین اورکسین–A در پلاسما و هیپوتالاموس تفاوت معنی داری بین قبل و بعد از آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد ندارد [۱۹]. اما در مدل ایسکمی/خونرسانی مجدد کبد، سطح اورکسین– A در کبد کاهش یافت [۲۰]. بعلاوه، Irving و همکاران نشان دادند که انسداد شریان مغزی موجب افزایش معنی دار بیان OX1R در موش های صحرایی می شود [۱۱]. همچنین Bulbul و همکاران نشان دادند که اورکسین– A در مقابل آسیب های القاء شده توسط ایسکمی/خونرسانی مجدد، با کاهش دادن فعالیت نوتروفیل ها و لیپید پروکسیداسیون، اثر حفاظتی بر روی معده دارد [۴]. لیکن، در مورد نقش اورکسین در حفاظت کبد تاکنون گزارشی منتشر نشده است. حضور اورکسین–A در کلیه نشان دهنده دخالت آن در آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیوی است. از اینرو، هدف از این تحقیق بررسی اثرات اورکسین–A بر روی کبد پس از آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیه در موش های صحرایی بود.

مواد و روش ها

آماده سازی حیوانات: ۲۱ سر موش صحرایی نر با محدوده



شکل ۱- نمای کلی پروتکل آزمایش

وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از نژاد اسپراگ–داولی به طور تصادفی انتخاب شدند. رت ها در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی گراد و شرایط محیطی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و از نظر مصرف آب و غذا در تمام دوره آزمایش محدودیتی نداشتند. مسائل اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی نظیر بیهوشی در هنگام جراحی زیر نظر کمیته اخلاق زیستی بخش زیست شناسی کاملاً رعایت گردید.

پس از گذشت یک هفته و حصول اطمینان از سلامت حیوانات موش های صحرایی با پنتوباربیتال سدیم (۶۰mg/Kg) بیهوش شده و سپس تراکئوتومی شدند. یک کانول، جهت تزریق نرمال سالین (کلرید سدیم ۱۵۰mM) توسط سرنگ پمپ (Syring infusion pump TE-331) با سرعت ۳ ml/h در سرتاسر آزمایش، در ورید فمورال چپ قرار داده شد. جهت تداوم بیهوشی از تزریق یکجای (۰/۰۵ ml) پنتوباربیتال سدیم (۲۵ mg/ml) در مواقع لزوم استفاده می گردید. کانول دیگری، جهت اندازه گیری فشار شریان کلیوی توسط ترانس دوسر فشار (P23DC pressure transducer; Gould Statham Instruments, USA)، در شریان فمورال چپ قرار داده شد. پس از باز کردن خط میانی شکم، مثانه جهت جمع آوری ادرار کانول گذاری شد، و سپس شریان و ورید هر دو کلیه با دقت از یکدیگر جدا گردیدند. یک ترمومتر نیز برای اندازه گیری دمای بدن و حفظ آن در محدوده ۱ ± ۳۷ درجه سانتی گراد در رکتوم حیوان قرار داده شد. فشار خون شریانی به صورت پیوسته توسط دستگاه بیولب ثبت می شد. پس از گذشت یک دوره ۲ ساعته استراحت جهت پایدار شدن وضعیت حیوان، مراحل آزمایش آغاز شدند.

پروتکل انجام تحقیق: در ابتدای هر آزمایش یک دوره کلیرانس کنترل نیم ساعته برای اندازه گیری سطوح پایه ای متغیرهای همودینامیک و عملکرد دفعی کلیه طی گردید. پس از آن یک دوره کلیرانس نیم ساعته قبل از القاء ایسکمی (دوره پیش درمان) انجام شد، و سپس ایسکمی توسط انسداد دوطرفه شریان های کلیوی با استفاده از کلمپ های غیرآسیب رسان ایجاد گردید. بعد از برداشتن کلمپ ها، یک دوره یک ساعته خونرسانی مجدد طی شد که در سرتاسر آن ادرار جمع آوری گردید. نمونه های خون شریانی (۱ ml) در انتهای تمامی دوره های کلیرانس و ایسکمی با سرنگ هپارینه سرد شده گرفته و بلافاصله سانترفیوژ شدند. پلاسما جدا گشته و سلول ها در یک حجم مساوی نرمال سالین مخلوط شده و مجدداً به حیوان تزریق شدند. نمونه های پلاسما در دمای ۲۰–درجه سانتی گراد تا زمان آزمایش نگهداری می گردیدند. در انتهای آزمایش نمونه های بافت کبد جدا و جهت بررسی های بافت شناسی تثبیت گردیدند. سپس حیوانات با دوز بالای بیهوشی معدوم شدند. حیوانات بطور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند (n=۷ در هر گروه). در گروه تیمار شده با اورکسین، اورکسین–A (Anestec, Arizona, USA) از طریق تزریق داخل وریدی پیوسته به میزان pmol/Kg/min ۵۰۰ [۴] از شروع دوره کلیرانس قبل از القاء ایسکمی (پیش درمان) داده می شد. در گروه I/R نرمال سیلین تزریق می شد. در گروه شاهد، شریان های کلیوی مسدود نمی شدند و نرمال سالین تزریق می گردید.

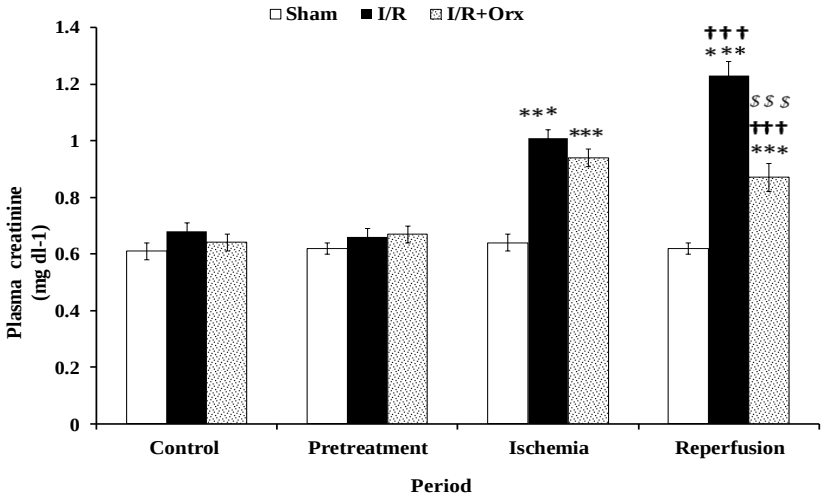
مطالعات هیستوپاتولوژی: در این تحقیق پس از قرار دادن نمونه های بافت کبد در پارافین، برش های ۵ میکرونی توسط میکروتوم (Erma, Japan) از آنها تهیه شد. رنگ آمیزی برش ها با هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد. هر برش در حداقل ۱۰ میدان جداگانه مشاهده و از نظر وجود احتقان و تغییرات دژنراتیو سلولی مورد بررسی قرار گرفت. سطح

تظاهرات پاتولوژیک بنابر میزان تغییرات درجه بندی شد: بدون تغییر با ۰، تغییرات کمتر از ۲۰٪ با ۱، تغییرات ۴۰٪ – ۲۱٪ با ۲، تغییرات ۶۰٪–۴۱٪ با ۳، تغییرات ۸۰٪ –۶۱٪ با ۴، تغییرات بیش از ۸۰٪ با ۵. مجموع تمام نمرات عددی در هر گروه به عنوان نمره کل هیستوپاتولوژیک در نظر گرفته شد [۳۵، ۳۶]. در پایان غلظت پلاسمایی کراتینین، نیتروژن اوره، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) توسط دستگاه اتوآنالایزر اندازه گیری شدند.

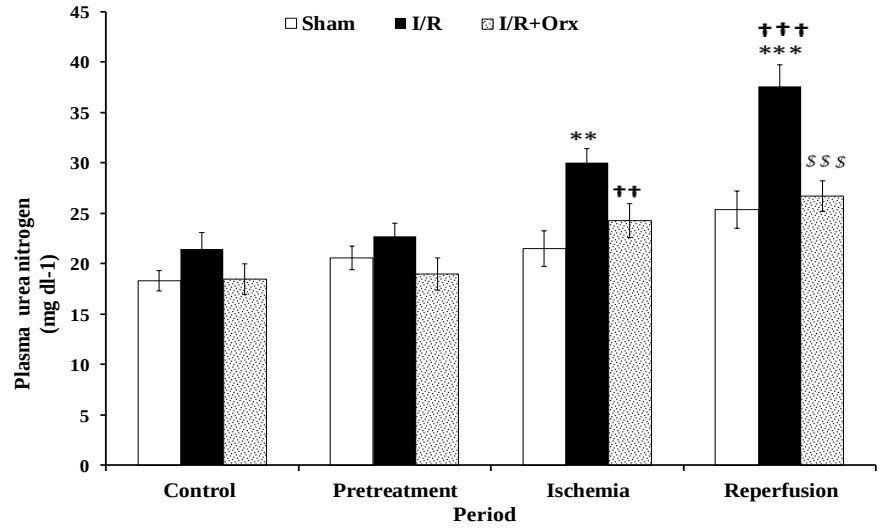
روش آماری: برای مقایسه کمیت‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون Duncan post test استفاده شد.

یافته ها

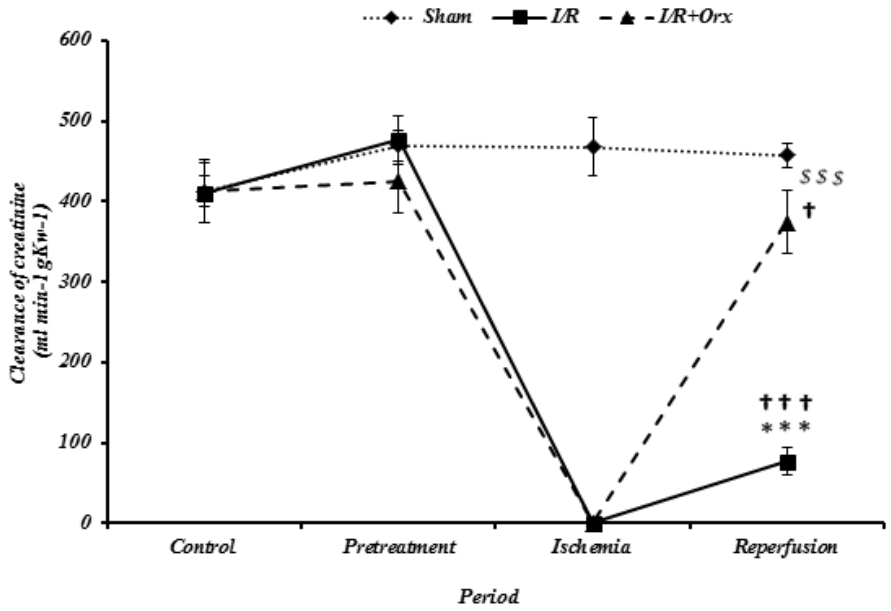
اورکسین–A و تغییرات القاء شده توسط ایسکمی/خونرسانی



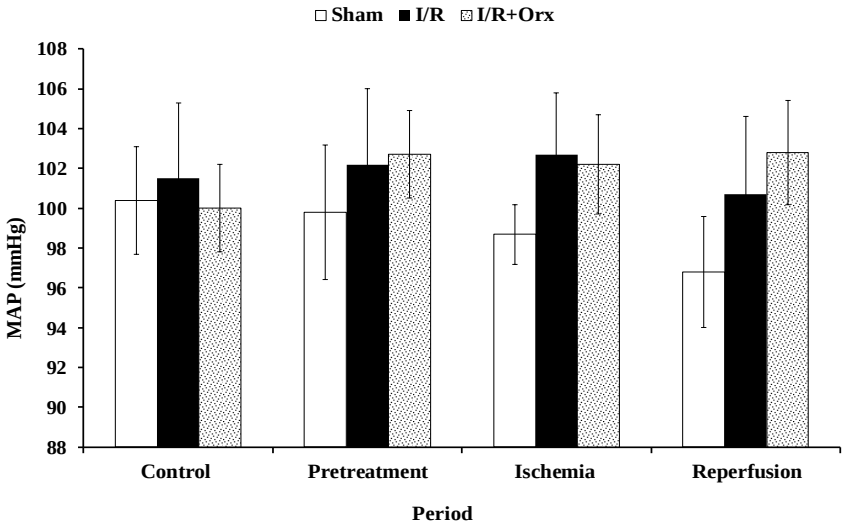
شکل ۲- مقادیرکراتینین به صورت میانگین ± خطای معیار در انتهای دوره های نیم ساعته کنترل و پیش درمان، و انتهای دوره ۱ ساعته خونرسانی مجدد بعد از نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی در گروه درمان نشده (گروه I/R) و گروه دریافت کننده دارو (I/R+Orx). در گروه Sham، شریانهای کلیه مسدود نشده اند.
$P<۰/۰۰۱^{***}$ در مقایسه با دوره کنترل همان گروه، $P<۰/۰۰۱^{\dagger\dagger\dagger}$ در مقایسه با دوره معادل در گروه Sham، و $P<۰/۰۰۱^{\$\$\$}$ درمقایسه با دوره معادل در گروه I/R



شکل ۳- مقادیر نیتروژن اوره پلاسما به صورت میانگین ± خطای معیار در انتهای دوره های نیم ساعته کنترل و پیش درمان، و انتهای دوره ۱ ساعته خونرسانی مجدد بعد از نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی در گروه درمان نشده (گروه I/R) و گروه دریافت کننده دارو (I/R+Orx). در گروه Sham، شریانهای کلیه مسدود نشده اند.
$P<۰/۰۱^{**}$، $P<۰/۰۰۱^{***}$ در مقایسه با دوره کنترل همان گروه، و $P<۰/۰۱^{\dagger\dagger}$ و $P<۰/۰۰۱^{\dagger\dagger\dagger}$ در مقایسه با دوره معادل در گروه Sham، و $P<۰/۰۰۱^{\$\$\$}$ در مقایسه با دوره معادل در گروه I/R

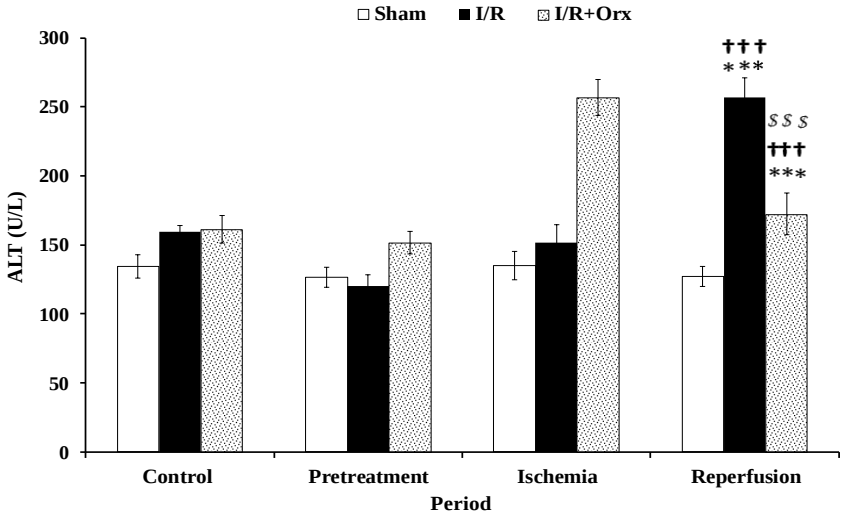


شکل ٤- مقادیر کلیرانس کرآتینین به صورت میانگین ± خطای معیار در انتهای دوره های نیم ساعته کنترل و پیش درمان، و انتهای دوره ۱ ساعته خونرسانی مجدد بعد از نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی در گروه درمان نشده (گروه I/R) و گروه دریافت کننده دارو (I/R+Orx). در گروه Sham، شریانهای کلیه مسدود نشده اند.
$P<۰/۰۰۱^{***}$ در مقایسه با دوره کنترل همان گروه، $P<۰/۰۵^{\dagger}$ و $P<۰/۰۰۱^{\dagger\dagger\dagger}$ در مقایسه با دوره معادل در گروه Sham، و $P<۰/۰۰۱^{\$\$\$}$ در مقایسه با دوره معادل در گروه I/R

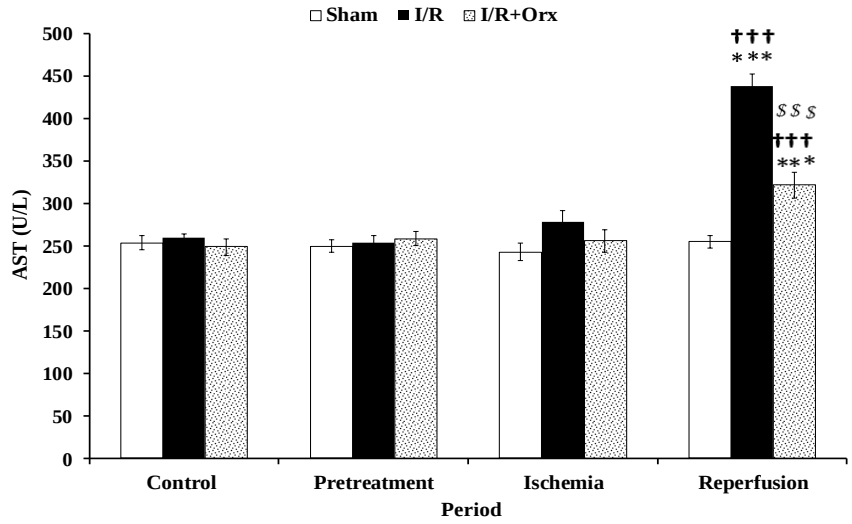


شکل ٥- مقادیر فشار متوسط خون شریانی به صورت میانگین ± خطای معیار در انتهای دوره های نیم ساعته کنترل و پیش درمان، و انتهای دوره ۱ ساعته خونرسانی مجدد بعد از نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی در گروه درمان نشده (گروه I/R) و گروه دریافت کننده دارو (I/R+Orx). در گروه Sham، شریانهای کلیه مسدود نشده اند.

مجدد کلیه در متغیرهای پلاسما: شکل های ۲ و ۳ نشان می دهند که سطح متغیرهای پلاسمایی در انتهای دوره های کنترل (مقادیر پایه) و پیش درمان تفاوت معنی داری را در بین گروه های مختلف ندارند. در انتهای دوره یک ساعته خونرسانی مجدد مقدار همه متغیرها در گروه شاهد با مقادیر پایه ای برابر بودند. در گروه های ایسکمیک، ۳۰ دقیقه ایسکمی/۱ ساعت خونرسانی مجدد باعث افزایش معنی دار ($P<۰/۰۰۱$) غلظت کراتینین و نیتروژن اوره پلاسما در مقایسه با مقادیر پایه ای آنها گردید. بعلاوه، سطوح کراتینین و نیتروژن اوره پلاسما در گروه I/R در انتهای دوره خونرسانی مجدد از مقادیرشان در گروه شاهد بالاتر بودند ($P<۰/۰۰۱$). مهمتر اینکه در گروه I/R + Orx غلظت کراتینین (شکل ۲) و نیتروژن اوره پلاسما (شکل ۳) در انتهای دوره خونرسانی مجدد پایین تر از غلظت هایشان در گروه I/R بودند ($P<۰/۰۰۱$)، در حالیکه با مقادیر گروه شاهد تفاوت معنی داری نداشتند.



شکل ٦- مقادیرALT پلاسما به صورت میانگین ± خطای معیار در انتهای دوره های نیم ساعته کنترل و پیش درمان، و انتهای دوره ۱ ساعته خونرسانی مجدد بعد از نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی در گروه درمان نشده (گروه I/R) و گروه دریافت کننده دارو (I/R+Orx). در گروه Sham، شریانهای کلیه مسدود نشده اند.
***P<۰/۰۰۱ در مقایسه با دوره کنترل همان گروه، †††P<۰/۰۰۱ در مقایسه با دوره معادل در گروه Sham، و $^{\$\$\$}$P<۰/۰۰۱ در مقایسه با دوره معادل در گروه I/R

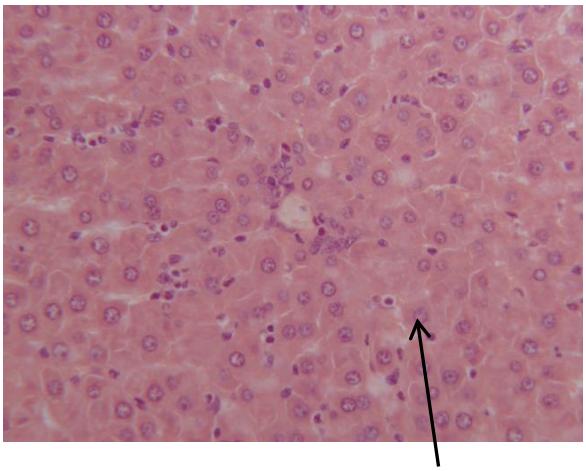


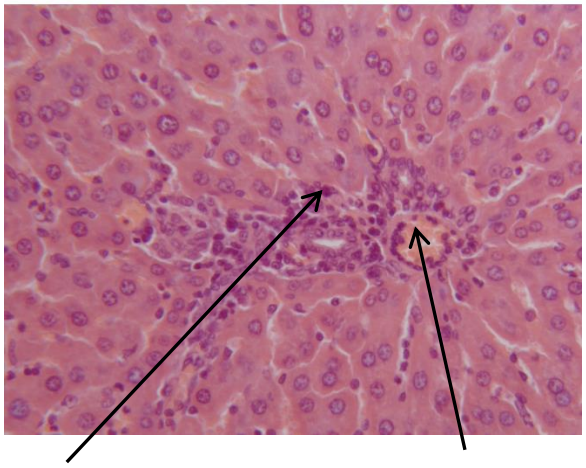
شکل ۷- مقادیر AST پلاسما به صورت میانگین ± خطای معیار در انتهای دوره های نیم ساعته کنترل و پیش درمان، و انتهای دوره ۱ ساعته خونرسانی مجدد بعد از نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی در گروه درمان نشده (گروه I/R) و گروه دریافت کننده دارو (I/R+Orx). در گروه Sham، شریانهای کلیه مسدود نشده اند.
***P<۰/۰۰۱ در مقایسه با دوره کنترل همان گروه، †††P<۰/۰۰۱ در مقایسه با دوره معادل در گروه Sham، و $^{\$\$\$}$P<۰/۰۰۱ در مقایسه با دوره معادل در گروه I/R

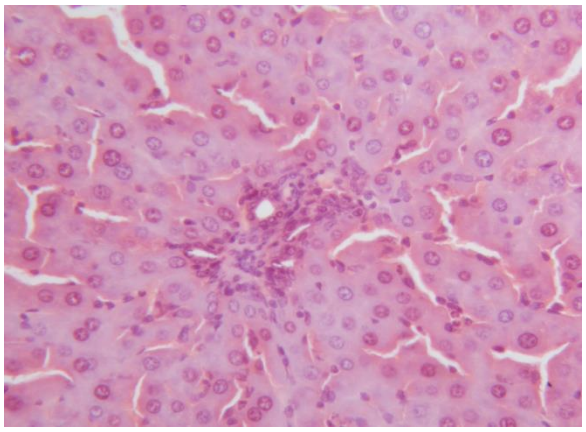
جدول ۱- درجه کل آسیبهای بافتی بعد از یک ساعت خونرسانی مجدد بدنبال نیم ساعت ایسکمی دو طرفه کلیوی در گروههای مختلف

Group	Histopathological score
Sham	0.0 ± 0.00
I/R	8.0 ± 0.25 [a]
I/R+Orx	2.6 ± 0.49 [ab]

[a] P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه Sham
[b] P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه I/R







شکل ۸- آپوپتوز و احتقان عروقی در مقطع عرضی از بافت کبد در گروه Sham (a)، گروه I/R (b)، گروه I/R+Orx (c)، با بزرگنمائی ۲۵۰× و رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین

اورکسین-A و تغییرات القاء شده توسط ایسکمی- خونرسانی مجدد در همودینامیک کلیه: شکل ۴ نشان می دهد که سطح متغیر همودینامیک در طی دوره های کنترل (مقدار پایه) و پیش درمان در همه گروه ها یکسان است. در گروه

شاهد کلیرانس کراتینین در طی دوره خونرسانی مجدد در مقایسه با مقدار پایه ای آن تفاوتی نداشت. در گروه I/R ایسکمی موجب کاهش ۸۷ درصدی کلیرانس کراتینین شد (P<۰/۰۰۱)، درحالیکه میانگین فشار خون شریانی در طی دوره خونرسانی مجدد با توجه به مقادیر پایه ای تغییری نکرد (شکل ۵). در گروه I/R+Orx مقدار کلیرانس کراتینین در طی دوره خونرسانی مجدد در مقایسه با مقدار پایه ای آن ۱۳ درصد کاهش یافت، اما تغییر معنی داری در میانگین فشار خون شریانی صورت نگرفت (شکل ۵).

اورکسین-A و ناکارآمدی کبدی القاء شده توسط ایسکمی-خونرسانی مجدد کلیه: شکل های ۶ و ۷ نشان می دهد که سطح آنزیم های کبد در انتهای دوره های کنترل (مقادیر پایه) و پیش درمان در بین گروه های مختلف تفاوت معنی داری ندارد. در انتهای دوره ۱ ساعته خونرسانی مجدد در گروه شاهد همه متغیرها در مقایسه با سطوح پایه ای ثابت ماندند. در تمام گروه های ایسکمیک، ۳۰ دقیقه ایسکمی/۱ساعت خونرسانی مجدد باعث افزایش معنی دار (P<۰/۰۰۱) در میزان ALT (شکل ۶) و AST (شکل ۷) در مقایسه با مقادیر پایه ای آنها گردید. بعلاوه، سطوح ALT و AST در انتهای دوره خونرسانی مجدد در گروه I/R بالاتر از مقادیرشان در گروه شاهد بودند (P<۰/۰۰۱). لیکن، مقادیر ALT (شکل ۶) و AST (شکل ۷) در انتهای دوره خونرسانی مجدد در گروه I/R + Orx پایین تر از مقادیرشان در گروه I/R بودند (P<۰/۰۰۱).

اورکسین-A و تغییرات بافتی القاء شده توسط ایسکمی-خونرسانی مجدد کلیوی در کبد: برش های بافت کبد در گروه شاهد کاملاً طبیعی بودند. اما در گروه I/R در مقایسه با گروه شاهد احتقان عروقی شدید (درجه ۵) مشاهده گردید (شکل ۸)، در حالیکه در گروه I/R + Orx احتقان عروقی با درجه ۲ ظاهر شد. پدیده آپوپتوز سلول های کبدی در گروه I/R با درجه ۳ مشاهده شد، در حالیکه در گروه I/R+Orx درجه آن به ۱ کاهش یافت (شکل ۸).

بحث

آسیب حاد کلیوی ایسکمیک با میزان بالای مرگ و میر همراه است. آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیه در موقعیت های کلینیکی مختلفی همچون پیوند، sepsis، هیدرونفروز یا جراحی دستگاه ادراری رخ می دهد. اگرچه بیشتر تحقیقات در این زمینه بر روی پاسخ کلیه به این آسیب متمرکز شده اند، مطالعات اخیر نشان می دهند که آسیب کلیوی روی کبد اثر می گذارد. در تحقیق حاضر تغییرات عملکردی و بافتی کبد در فاز اولیه خونرسانی مجدد کلیه بررسی شدند. بعلاوه، مشخص گردید که استفاده از اورکسین-A قبل از ایسکمی می تواند ناکارآمدی کبدی القاء شده توسط نارسایی حاد کلیوی را تعدیل نماید.

در حیواناتی که در معرض ایسکمی/خونرسانی مجدد قرار گرفته و اورکسین-A را دریافت نموده بودند (گروه I/R + Orx)، کاهش GFR در مقایسه با گروه I/R تخفیف یافت (شکل ۴). شکل ۵ نشان می دهد که سطوح میانگین فشار خون شریانی در طی دوره آزمایش در تمام گروه ها یکسان بود، از اینرو اختلافات کلیرانس کراتینین در بین گروه ها در این دوره ارتباطی به سطح میانگین فشار خون شریانی نداشتند. کاهش GFR در آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد به دلایل متعددی صورت می گیرد که از مهم ترین آنها می توان به کاهش جریان خون ناشی از عدم تعادل بین تولید مواد تنگ کننده و گشاد کننده عروق پس از ایسکمی اشاره کرد [۳، ۳۹]. از آنجا که بعضی از مطالعات حیوانی نشان داده اند که ایسکمی/خونرسانی مجدد با کاهش اورکسین-A مرتبط است [۹، ۱۱، ۲۳]، حدس زده می شود که تنگی عروق کلیوی القاء شده توسط ایسکمی/خونرسانی مجدد در اثر کاهش اورکسین-A ایجاد شده باشد. از اینرو اورکسین-A توانسته است در گروه I/R + Orx کاهش GFR را کم کند.

در این تحقیق سطح ALT و AST به عنوان شاخص آسیب سلولی پارانشیم کبد اندازه گیری شد. نتایج نشان دادند که سطوح ALT و AST بعد از آسیب ایسکمی/خونرسانی مجدد (۳۰ دقیقه/۱ ساعت) افزایش یافتند (شکل ۶ و ۷). در حالیکه، اورکسین-A از تغییرات فعالیت آنزیم های ALT و AST جلوگیری کرد. آنزیم های ALT و AST جزو مهم ترین مارکرهای آسیب کبدی ایجاد شده توسط ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیوی هستند [۱۰، ۱۳، ۴۱]. رها شدن این آنزیم ها به داخل گردش خون در پی آسیب

هپاتوسیت ها منجر به افزایش فعالیت آنها در خون می گـردد. افزایش فعالیت ALT که معمـولاً بـا افـزایش فعالیـت AST همراه است، هنگام آسیب، تکثیر یا دژنره شدن هپاتوسـیت هـا صورت می گیرد [۳۰]. در این تحقیق سـاختار بافـت شناسـی کبـد بـه منظـور تعیـین میـزان آسـیب القـاء شـده توسـط ایسکمی/خونرسانی مجـدد کلیـه مـورد مطالعـه قـرار گرفـت. بررسی برش های گروه I/R احتقان عروقـی و آپوپتـوز سـلول هـای کبـد را نشـان داد. از اینـرو، ترکیبـی از ایـن دو فـاکتور احتمالاً مسئول کاهش عملکرد کبد پس از ایسـکمی در گـروه I/R بوده‌اند. یکی از عوامل مهم ایجاد مـرگ سـلولی برنامـه ریزی شده، گونه های واکنش گر اکسیژن (ROS) هسـتند کـه در زمان آسیب ایسکمی/خونرسانی مجـدد تولیـد شـده[۲]، بـا پاسخ التهابی مرتبط می باشند [۶، ۱۷، ۲۷] و در غلظت هـای متوسط باعث القاء آپوپتوز می شوند [۳۲، ۳۸]. اخیـراً، Park و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده اند که هر دو آسـیب هـای ایسکمیک و غیر ایسکمیک کلیه تولید اینترلوکین-17A را در روده کوچک آغاز می کند که منجر به التهاب، آپوپتوز و نکروز کبد می گردد. آنها نقش قاطعی را برای فاکتور نکروز تومـور-آلفا، اینترلوکین-17A و اینترلوکین-۶ در تولید این آسـیب هـا نشان دادند. همچنین آنها مدرکی ارائه دادند مبنـی بـر اینکـه اینترلوکین-17A مشتق از روده کوچک موجـب تولیـد بیشـتر سیتوکین می شود تا آسـیب کبـدی و التهـاب سیسـتمیک را ایجاد نماید [۲۶]. از سوی دیگر تعـدادی از مطالعـات حیـوانی نشـان داده انـد کـه ایسکمی/خونرسـانی مجـدد بـا کـاهش اورکسین-A مرتبط می باشد. بنابراین، پیشنهاد مـی شـود کـه آسیب کبدی القاء شده توسط ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیـه ممکن است توسط کاهش اورکسین-A القـاء شـده باشـد. در گروه در معرض قرار گرفتـه بـا ایسکمی/خونرسـانی مجـدد و دریافت کننده اورکسـین-A (I/R + Orx) احتقـان عروقـی و آپوپتوز تخفیف یافتند، که نشان می دهد کاهش اورکسین- A در طی دوره خونرسـانی مجـدد مـی توانـد مسـئول بخشـی از کاهش عملکرد کبد باشد.

بطور کلی ۳۰ دقیقه ایسکمی و ۱ ساعت خونرسانی مجدد نارسایی حاد کلیوی را در مـوش هـای صـحرایی القـاء نمـود. لیکن، دادن اورکسین-A قبل از و در طـی ایسـکمی GFR و عملکرد کبد را بهتر کرد و توانست احتقـان عروقـی و آپوپتـوز سلول های کبد را کاهش دهد. مهار رویدادهای التهابی پس از ایسکمی نقش مهمی را در رابطـه بـا اثـرات بهبـودی بخـش اورکسین-A بر کلیه و کبـد ایفـا مـی‌نمایـد. بعـلاوه، چنـدین خصوصیت مفید اورکسـین-A در تحقیقـات دیگـر بـه اثبـات رسیده‌اند، از جملـه: افـزایش غـذا خـوردن، افـزایش سـرعت متابولیسم و دمای بدن، و ایجاد واکنش ضد درد در موش های صحرایی و سوری [۹، ۲۳، ۳۳]. لـیکن مطالعـات روی اثـرات حفاظتی آن در مدل ایسکمی/خونرسانی مجدد محدود هستند. پیشنهاد می شود که اورکسین-A در جلوگیری از آسیب انـدام پس از ایسکمی/خونرسانی مجدد مفید باشد.

نتیجـه گیـری: دادن اورکسـین-A قبـل از و در طـی ایسکمی-خونرسانی مجدد در کلیه ها سبب بهبود عملکرد کلیه و کاهش آسیب های بافتی کبدی ناشی از این عمل می گردد.

سپاسگزاری

این تحقیق در بخش زیست شناسی دانشگاه شـیراز و بـا اسـتفاده از گرنت شماره GR-SCST-117-88 انجام گرفته است. از زحمات سرکار خانم حمیده جبه دارباشـی جهـت همکـاری در تهیـه اسـلایدهای بافـت شناسی در بخش پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز قدردانی می گردد.

References

[1] Arihara Z K, Takahashi O, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S , Mouri T, Immunoreactive orexin-A in human plasma. ***Peptides*** 22 (2001) 139-142.

[2] Bhalodia YS, Sheth NR, Vaghasiya JD, Jivani NP, Hyperlipidemia enhanced oxidative stress and inflammatory response evoked by renal ischemia/reperfusion injury. ***Int J Pharmacol*** 6 (2010) 25-30.

[3] Brady HR, Clarkson MR, Liberthal W, ***Acute renal failure***. In: Brenner BM, editor. The Kidney, 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders (2004) 1215-1292.

[4] Bulbul, an R, Gemici B, Ongut G and Izgut-Uysal N, Effect of orexin-a on ischemia–reperfusion-induced

gastric damage in rats. ***J Gastroenterol*** 43 (2008) 202-207.

[5] Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M, Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. ***Cell*** 98 (1999) 437-451.

[6] Cuzzocrea S, McDonald MC, Filipe HM, Costantino G, Mazzon E,Santagati S,Caputi AP,Thiemermann C, Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. ***Eur J Pharmacol*** 390 (2000) 209-222.

[7] Dalal M A, Schuld A, Haack M, Uhr M, Geisler P, Eisensehr I, Noachtar S, Pollmacher T, Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. ***Neurology*** 56 (2001) 1749-1751.

[8] Dohi K, Ripley B, Fujiki N, Ohtaki H, Shioda S, Aruga T, Nishino S, CSF hypocretin-1/orexin-A concentrations in patients with subarachnoid hemorrhage (SAH). ***Peptides*** 26 (2005) 2339-2343.

[9] Dohi K, Nishino S, Nakamachi T, Ohtaki H, Morikawa K, Takeda T, Shioda S, Aruga T, CSF orexin A concentrations and expressions of the orexin-1 receptor in rat hippocampus after cardiac arrest. ***Neuropeptides*** 40 (2006) 245-250.

[10] Giannini EG, Testa R, Savarino V, Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. ***Can Med Assoc J*** 172 (2005) 367-379.

[11] Irving EA, Harrison DC, Babbs AJ, Mayes AC, Campbell CA, Hunter AJ, Upton N, Persons AA, Increased cortical expression of the orexin-1 receptor following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. ***Neurosci Lett*** 324 (2002) 53-56.

[12] Johren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P, Preproorexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. ***Endocrinol*** 142 (2001) 3324-3331.

[13] Kadkhodaee M, Golab F, Zahmatkesh M, Ghaznavi, Effects of different periods of renal ischemia on liver as a remote organ. World J ***Gastroenterol*** 15 (2009) 1113-1118.

[14] Katugampola S and Davenport A, Emerging roles for orphan G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. ***Trends Pharmacol Sci*** 24 (2003) 30-35.

[15] Kelly KJ, Acute renal failure: much more than a kidney disease. ***Semin Nephrol*** 26 (2006) 105-113.

[16] Kielar ML, Rohan Jeyarajah D, Lu CY, The regulation of ischemic acute renal failure by extrarenal organs. ***Curr Opin Nephrol Hypertens*** 11 (2002) 451-457.

[17] Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F, Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. ***J Leukoc Biol*** 75 (2004) 1156-1165.

[18] Lemay S, Rabb H, Postler G, Singh AK, Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. ***Transplantation*** 69 (2000) 959-963.

[19] Lin J, Yan G, Gao X, Liao J, Hao X, Zhang K, Effect of intestinal ischemia/reperfusion injury on leptin and orexin-A levels. ***Front Med*** 1 (2007) 87-92.

[20] Lin J, Yan G, Xue H, Hao X, Zhang K,Wang L, Orexin-A in hepatic reperfusion-induced liver injury in rats. ***J Cent South Univ*** 34 (2009) 1078-1085.

[21] Miyazawa S, Watanabe H, Miyaji C, Hotta O, Abo T, Leukocyte accumulation and changes in extra-renal organs during renal ischemia reperfusion in mice. ***J Lab Clin Med*** 139 (2002) 269-278.

[22] Nakabayashia M, Suzukia T,, Takahashib K, Totsunec K, Muramatsua Y, Kanekoa C, Datea F, Takeyamaa J, Darnela AD, Moriyaa T, Sasano H, Orexin-A expression in human peripheral tissues. ***Mol Cell Endocrinol*** 205 (2003) 43-50.

[23] Nakamachi T, Endo S, Ohtaki H, Yin L, Kenji D, Kudo Y, Funahashi H, Matsuda K, Shioda S ,Orexin-1 receptor expression after global ischemia in mice. ***Regul Pept*** 126 (2005) 49-54.

[24] Nakatani T, Kim T, Uchida J, Kumata N, Kawashima H, Sugimura K, Hepatocyte growth factor ameliorates renal hemodynamic disorder after ischemia/reperfusion. ***Int J Mol Med*** 10 (2002) 217-219.

[25] Park SW, Chen SWC, Kim M, Brown KM, Kolls JK, D'Agati DD, Lee HT, Cytokines induce small intestine and liver injury after renal ischemia or nephrectomy. ***Lab Invest*** 91 (2011) 63-84.

[26] Paladino JD, Hotchkiss JR, Rabb H, Acute kidney injury and lung dysfunction: a paradigm for remote organ effects of kidney disease. ***Microvasc Res*** 77 (2009) 8-

12.

[27] Pawliczak R. The role of radical oxygen species in airway inflammation. ***Pol Merkuriusz Lek*** 14 (2003) 493-496.

[28] Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E, Oxidative stress and cell signaling. ***Curr Med Chem*** 11 (2004) 1163-1182.

[29] Rabb H, Chamoun F, Hotchkiss J, Molecular mechanisms underlying combined kidney-lung dysfunction during acute renal failure. ***Contrib Nephrol*** (2001) 41-52.

[30] Ravikumar V, Shivashangari KS, Devaki T, Hepatoprotective activity of Tridax procumbens against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatitis in rats. ***J Ethanopharmacol*** 101 (2005) 55-60.

[31] Remick DG, Villarete L, Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. ***J Leukoc Biol*** 59 (1996) 471-475.

[32] Renz A, Berdel WE, Kreuter M, Belka C, Schulze-Osthoff K, Los M, Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death in vivo. ***Blood*** 98 (2001) 1542-1548.

[33] Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JCG, Blundell JE, Orexins and appetite regulation. ***Neuropeptides*** 36 (2002) 303-325.

[34] Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ and Yanagisawa M, Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein– coupled receptors that regulate feeding behavior. ***Cell*** 92 (1998) 585-573.

[35] Schwartz MM, Lan SP, Bernstein J, Hill GS, Holley K, Lewis EJ, The lupus nephritis collaborative study group. Irreproducibility of the acitivty and chronicity indices limits their utility in the management of lupus nephritis. ***Am J Kidney Dis*** 21 (1993) 374-377.

[36] Strenberg SS, editor. ***Diagnostic surgical pathology***, Lippincott: Williams & Wilkins, 1996.

[37] Sural S, Sharma RK, Gupta A, Sharma AP, Gulati S, Acute renal failure associated with liver disease in India: Etiology and outcome. ***Ren Fail*** 22 (2000) 623-634.

[38] Takeda M, Shirato I, Kobayashi M, Endou H, Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. ***Nephron*** 81 (1999) 234-238.

[39] Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/ reperfusion. Clin Immunol 123 (2007) 7-13.

[40] Voisin T, Rouet-Benzineb P, Reuter N and Laburth M, Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. ***Cell Mol Life Sci*** 60 (2003) 72-87.

[41] Wang B, Bai M, Bai Y, Li Q, Liver injury following renal ischemia reperfusion in rats. ***Transplant Proc*** 42 (2010) 3422-3426.