



## Effect of Losartan injection into paraventricular nucleus on the deleterious effects of angiotensin II in renal ischemia-reperfusion injury

Behjat Seifi<sup>1\*</sup>, Mehri Kadkhodaei<sup>1</sup>, Enayatollah Bakhshi<sup>2</sup>, Maryam Zahmatkesh<sup>3</sup>, Mina Ranjbaran<sup>1</sup>, Zahra Sedaghat<sup>4</sup>

1. Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. of Biostatistics, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran

3. Dept. of Neurosciences and Addiction, School of Advanced in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Dept. of Physiology and Pharmacology, Medical School, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

Received: 13 Mar 2014

Accepted: 7 Jun 2014

### Abstract

**Introduction:** The aim of this study was to investigate the effect of angiotensin II (Ang II) and losartan injections into paraventricular nucleus (PVN) on renal ischemia-reperfusion injury.

**Methods:** After right nephrectomy in male rats, a cannula was inserted into the right PVN. One week later, renal ischemia-reperfusion (IR) injury was induced by clamping the left renal artery for 45 min, and then the kidney was reperfused for 24 h. An Ang II AT1 receptor antagonist, losartan (0.3 µg) was injected into the PVN 20 minutes before the induction of ischemia, followed by 3 ng of Ang II after 10 minutes. Blood, urine and kidney samples in addition to the brain area containing the PVN were collected to evaluate different indices. Renal sympathetic nerve activity (RSNA) was recorded in all groups.

**Results:** Angiotensin II injection into PVN caused significant increases in renal functional (plasma creatinine and BUN as well as urinary NAG activity) and histological indices in comparison to IR group ( $p < 0.05$ ). Losartan injection before Ang II into PVN significantly reduced these markers ( $p < 0.05$ ). In addition, angiotensin II caused significant increases in oxidative stress in PVN (higher MDA and lower SOD) and RSNA compared to the IR group ( $p < 0.05$ ). Losartan improved these markers significantly ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** This study showed that Ang II injection into PVN increases oxidative stress in PVN and renal sympathetic nerve activity through AT1 receptors and exaggerates renal ischemia-reperfusion injury.

**Key words:** Hypothalamic paraventricular nucleus, Angiotensin II, AT1 receptor, Oxidative stress, renal ischemia-reperfusion injury

\* Corresponding author e-mail: b-seifi@tums.ac.ir  
Available online at: [www.phypha.ir/ppj](http://www.phypha.ir/ppj)

## اثر تزریق لوزارتان در هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس بر اثرات مخرب آنژیوتانسین II بر آسیب ایسکمی-رپرفیوژن کلیه

- بهجت سیفی<sup>۱\*</sup>، مهری کدخدایی<sup>۱</sup>، عنایت اله بخشی<sup>۲</sup>، مریم زحمتکش<sup>۳</sup>، مینا رنجبران<sup>۱</sup>، زهرا صداقت<sup>۴</sup>
۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
  ۲. گروه کامپیوتر و آمار حیاتی، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران
  ۳. گروه علوم اعصاب و اعتیاد، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
  ۴. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر
- دریافت: ۲۲ اسفند ۹۲ پذیرش: ۱۷ خرداد ۹۳

### چکیده

**مقدمه:** این مطالعه به بررسی اثر تجویز مرکزی آنژیوتانسین II و آنتاگونیست رسپتورهای AT1 بر آسیب حاد کلیوی بدنال ایسکمی-رپرفیوژن کلیوی می پردازد.

**روش ها:** یک هفته بعد از نرکتومی راست و تعبیه کانول در هسته پاراونتریکولار راست در موش های صحرایی نر ایسکمی کلیوی به مدت ۴۵ دقیقه القا شد. آنژیوتانسین II با دوز ۳ نانوگرم ۱۰ دقیقه قبل از القای ایسکمی کلیه و لوزارتان با دوز ۰/۳ میکروگرم ۱۰ دقیقه قبل از تزریق آنژیوتانسین II بدخل هسته پاراونتریکولار تجویز شدند. بعد از ۲۴ ساعت رپرفیوژن، نمونه خون و ادرار، نمونه کلیه و قسمتی از مغز حاوی هسته پاراونتریکولار بر داشته شدند. فعالیت عصب سمپاتیک کلیوی در همه گروه ها ثبت شد.

**یافته ها:** آنژیوتانسین II در هسته های پاراونتریکولار باعث افزایش معنادار آسیب عملکردی (افزایش BUN، کراتینین پلاسما و فعالیت NAG ادراری،  $P < 0/05$ ) و بافتی کلیه نسبت به گروه فقط ایسکمی-رپرفیوژن شد. تزریق لوزارتان قبل از آنژیوتانسین II توانست باعث کاهش معنادار آسیب شود. آنژیوتانسین II همچنین باعث افزایش استرس اکسیداتیو (افزایش MDA و کاهش SOD  $p < 0/05$ ) در هسته های پاراونتریکولار و افزایش فعالیت عصب سمپاتیک کلیه شد و لوزارتان منجر به بهبود معنادار این شاخص ها شد.

**نتیجه گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که تزریق آنژیوتانسین II در هسته های پاراونتریکولار توسط گیرنده های AT1 باعث افزایش استرس اکسیداتیو در این هسته ها و بدنال آن افزایش فعالیت سمپاتیک کلیوی می شود و بدین ترتیب تزریق آنژیوتانسین دو در هسته پاراونتریکولار باعث تشدید آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن می شود.

**واژه های کلیدی:** هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس، آنژیوتانسین II، رسپتورهای AT1، استرس اکسیداتیو، آسیب ایسکمی رپرفیوژن کلیوی

### مقدمه

[۲۹]. مکانیسم دقیق ایجاد کننده آسیب حاد کلیوی ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن (Ischemia-Reperfusion, IR) به خوبی شناخته نشده است. افزایش فعالیت سمپاتیک کلیوی و اثرات بعدی افزایش نور اپی نفرین می تواند یکی از عوامل درگیر در آسیب حاد کلیوی ناشی از ایسکمی-رپرفیوژن کلیه باشد [۲۰، ۸]. فیبرهای پس گانگلیونی سمپاتیک همه قسمت های کلیه شامل ساختار عروقی، توبولی و دستگاه پهلوی

آسیب حاد کلیوی (Acute Kidney Injury, AKI) یک سندرم کلینیکی شایع با مرگ ومیر و عوارض بالا می باشد

b-seifi@tums.ac.ir  
www.phypha.ir/ppj

\* نویسنده مسئول مکاتبات:  
وبگاه مجله:

افزایش تولید ROS در هسته پاراونتریکولار و تاثیر محیطی بر سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی بر روی آسیب حاد کلیوی بدنبال ایسکمی-رپرفیوژن کلیوی پرداخته ایم.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی از موش های نر نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در یک اتاق با نور قابل کنترل و چرخه ۱۲ ساعته تاریکی و روشنایی قرار گرفته و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. پروتکل های آزمایش و روش مراقبت از حیوانات در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران مورد تایید قرار گرفت.

همه حیوانات مورد مطالعه با پنتوباریتال سدیم به میزان ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. حیوانات در وضعیت پهلو قرار داده شدند و نفروکتومی سمت راست انجام شد. سپس حیوانات در دستگاه استروتاکس قرار گرفته و محل هسته پاراونتریکولار راست کانوله شد. مختصات مربوط به این ناحیه عبارتند از: ۱/۸-۱/۵ میلیمتر پشت برگما، ۰/۴ میلیمتر در کنار خط وسط و ۷/۷-۷/۹ میلیمتر و نترال نسبت به سطح پشتی. برای جلوگیری از عفونت ۲۲ میلی گرم/کیلوگرم بطور عضلانی به حیوانات آمپی سیلین تزریق شد.

یک هفته بعد از گذاشتن کانول حیوانات مجددا بیهوش شدند و شریان فمور سمت راست برای ثبت فشار خون شریانی کانوله شد. ۱۰ دقیقه بعد از تزریق آنژیوتانسین II به داخل هسته پاراونتریکولار ایسکمی رپرفیوژن کلیه القا شد. برای القای ایسکمی حیوانات در وضعیت پهلو چپ قرار گرفته و شریان کلیوی با یک کلمپ نرم به مدت ۴۵ دقیقه مسدود شد. سپس محل برش در دو لایه دوخته شده و رپرفیوژن برای ۲۴ ساعت برقرار گردید. برای تعیین حجم ادرار ۲۴ ساعته حیوانات در قفس متابولیک قرار گرفتند. در طول بیهوشی فشار خون شریانی حیوانات کنترل و دمای رکتال بدن آنها با استفاده از چراغ و پد گرم کننده در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  نگه داشته شد. در این مطالعه ۴ گروه ۶ تایی وجود داشت. ۱- در گروه آنژیوتانسین، Ang II با دوز ۳ نانوگرم، ۱۰ دقیقه قبل از القای ایسکمی کلیه و در گروه دیگر ۲- لوزارتان (آنتاگونیست

گلوامرولی را عصب دهی می کند. بدین ترتیب جای تعجب نیست که تغییر در فعالیت سمپاتیک کلیوی بر چندین جنبه عمل کلیوی، جریان خون کلیه، مقاومت عروقی، جذب آب و سدیم توبولی و رهایی رنین نقش داشته باشد [۱۵].

آنژیوتانسین دو (AngII) به عنوان یک نوروترانسمیتر در تنظیم فعالیت عصبی سمپاتیک درگیر است [۲۴]. علاوه بر AngII موجود در گردش خون که از سیستم رنین- آنژیوتانسین کلیوی مشتق می شود محل های خاصی در مغز موجود هستند که حاوی یک سیستم رنین- آنژیوتانسین بافتی بوده و به طور موضعی و پاراکرین AngII تولید می کنند [۲۸]. تولید موضعی AngII در نواحی تنظیمی قلبی-عروقی شامل ارگان های دور بطنی خصوصا ارگان زیر فورنیکسی و هسته پاراونتریکولار (PVN) در هیپوتالاموس توسط رنین و آنژیوتانسینوژن نورونی و گلیالی صورت می گیرد [۱]. مطالعات آناتومیکی رسپتورهای AT1 را در PVN مشخص کرده است و مطالعات الکتروفیزیولوژی نیز مشخص کرده اند که آنژیوتانسین II نورون های PVN را تحت تاثیر قرار می دهد [۲]. PVN مرکز جامعیت دهنده اصلی سیستم اتونوم می باشد. تعدادی از نورون های PVN به محل هایی از سیستم عصبی مرکزی می روند که سیستم اتونوم را تنظیم و تعدیل می کنند و نورون های PVN چه به صورت مستقیم و چه غیر مستقیم فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک را کنترل می کنند [۴، ۱۳].

گونه های واکنشی اکسیژن (ROS) در مغز در سیگنالینگ عصبی دخالت دارند و می توانند به تحریک سمپاتیک و هیپرتانسیون کمک کند [۱۴، ۲۳]. در مغز افزایش بیان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اثرات بالا برنده فشار خون مرکزی آنژیوتانسین II را کاهش می دهد [۳۳]. استرس اکسیداتیو در هسته های پاراونتریکولار نقش محوری در تحریک سمپاتیک در هیپرتانسیون دارد و این افزایش تولید استرس اکسیداتیو بوسیله رسپتورهای AT1 آنژیوتانسین ایجاد می گردد [۱۱].

با توجه به نقش آنژیوتانسین II در هسته های پاراونتریکولار هیپوتالاموس و اثر سیستم عصبی سمپاتیک بر آسیب ایسکمی-رپرفیوژن کلیوی، در این مطالعه ما به بررسی تجویز مرکزی آنژیوتانسین II و اثر آن بر رسپتورهای AT1 و

شد. زمانی که یک نسبت مناسب سیگنال به نویز بدست آمد الکتروود و عصب بوسیله ژل سیلیکون پوشیده شدند. سیگنال های عصب بوسیله یک آمپلی فایر AC/DC (ML136) با cutoff فرکانس کم ۱۰ هرتز و cutoff فرکانس بالای ۵۰۰ هرتز به میزان ۲۰۰۰۰ بار تقویت شدند. سیگنال های تقویت شده و فیلتره شده در ثابت زمانی ۱۰۰ میلی ثانیه جمع بندی شدند. در پایان هر آزمایش فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک (RSNA) خام و جمع بندی شده بطور همزمان بوسیله سیستم جمع آوری اطلاعات PowerLab ثبت شد. درصد تغییر در RSNA جمع بندی شده نسبت به مقدار پایه بعد از هر مداخله محاسبه شد [۶، ۹].

کلیه ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس و پس از آب گیری در پارافین قالب گیری گردید. از این کلیه ها مقاطع بافتی (۴ میکرومتر) تهیه و با ائوزین و هماتوکسیلین رنگ آمیزی شد. بررسی مقاطع بافتی با میکروسکوپ نوری انجام گردید. همه مقاطع کلیه حداقل در ۱۰ حوزه تصادفی که با هم تداخل نداشتند با بزرگنمایی ۴۰۰ نمره داده شدند. دیلاتاسیون توبولی، واکوئولاسیون سلولی، تخریب سلولی، از دست رفتن لبه بروسی توبول پروگزیمال و حضور cast های لومینال و مواد پروتئینی نشان دهنده آسیب بودند.

سطوح مالون دی آلدیید (MDA) در نمونه های بافتی با توجه به روش Esterbauer و Cheeseman تعیین شد [۵]. مالون دی آلدیید با تیوباربیتوریک اسید (TBA) واکنش نشان داده و سبب تولید رنگدانه صورتی شده که حداکثر جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر است.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) بافتی مطابق با روش Paoletti و Mocali تعیین شد [۲۲]. در این آزمایش، آنیون سوپر اکسید از اکسیژن، در حضور EDTA، مراکپتواتانول و کلرید منگنز (II) تولید می شود. اکسیداسیون NADPH با در دسترس بودن آنیون های سوپراکسید در محیط، مرتبط است.

نتایج به صورت  $mean \pm SEM$  بیان شده است. به منظور انجام مقایسه بین گروه های آزمایشی، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و سپس تست توکی استفاده شد.  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

رسپتور AT1، به میزان ۰/۳ میکروگرم) ۱۰ دقیقه قبل از تزریق آنژیوتانسین به داخل هسته پاراونتریکولار تزریق شدند. ۳- در یک گروه نیز فقط ایسکمی رپرفیوژن کلیه القا شد و بجای آنژیوتانسین در هسته پاراونتریکولار سالین تزریق شد. ۴- در گروه شم شریان کلیوی فقط نمایان شد و بسته نشد. حجم تزریق ها کلا ۵۰۰ نانولیتزر بود. در تمام گروه ها ثبت از عصب سمپاتیک کلیوی قبل و در طول دقایق اول ایسکمی انجام شد. در پایان زمان رپرفیوژن نمونه خون جهت بررسی عملکرد کلیوی، نمونه ادرار جهت بررسی غلظت ادراری NAG (ان-استیل-بتا-دی گلوکزآمین) بعنوان شاخصی از آسیب توبولی و نمونه کلیه جهت بررسی های بافت شناسی برداشته شد. در ضمن قسمتی از مغز که حاوی هسته پاراونتریکولار است در آورده شد و بعد از هموژناسیون شاخص های استرس اکسیداتیو در آن اندازه گیری شد.

برای تشخیص محل صحیح تزریق در هسته پاراونتریکولار، به داخل هسته پاراونتریکولار در بعضی از حیوانات بطور تصادفی در پایان آزمایش ۵۰ نانولیتزر اوانس بلو ۲٪ تزریق شد. سپس مغز از جمجمه برداشته شد و در فرمالین ۱۰٪ فیکس شد و پس از آب گیری در پارافین قالب گیری گردید. از نمونه های مغزی مقاطع بافتی (۶-۵ میکرومتری) تهیه و با ائوزین و هماتوکسیلین رنگ آمیزی شد. با بررسی مقاطع بافتی توسط میکروسکوپ نوری و مقایسه با اطلس پاکسینوز محل صحیح تزریق شناسایی شد.

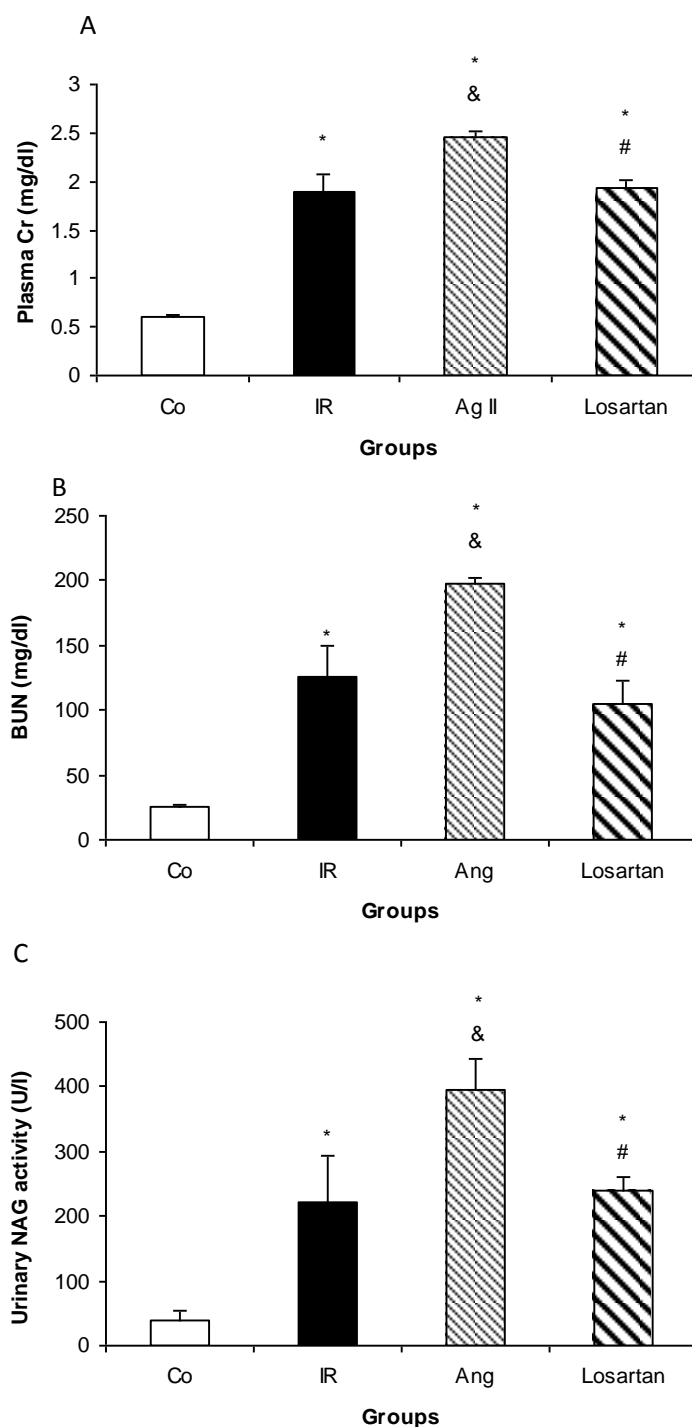
غلظت پلاسمایی کراتینین و نیتروژن اوره خون (BUN) توسط روش کالریمتری با استفاده از کیت های تجاری در دسترس تعیین شد. دفع ادراری یا فعالیت آنزیمها بخصوص N-استیل-بتا-D-گلوکزآمینیداز (NAG) یک متد سریع و غیرتهاجمی در تشخیص و پی گیری عملکرد توبولهای کلیوی در شرایط مختلف می باشد. از فعالیت NAG ادراری بعنوان شاخصی برای آسیب توبول پروگزیمال استفاده می شود. فعالیت NAG ادراری توسط هیدرولیز آنزیمی p-نیترو فنیل بتا دی گلوکزآمینیداز و با سنجش اسپکتروفتومتری یون p-نیتروفنیلات در طول موج ۴۰۲ نانومتر انجام شد [۱۲].

برای ثبت از عصب سمپاتیک کلیوی قبل و در طول ایسکمی، این عصب با یک برش رتروپریوتوان با استفاده از یک لوپ جدا گردید. عصب بر روی یک جفت الکتروود نقره گذاشته

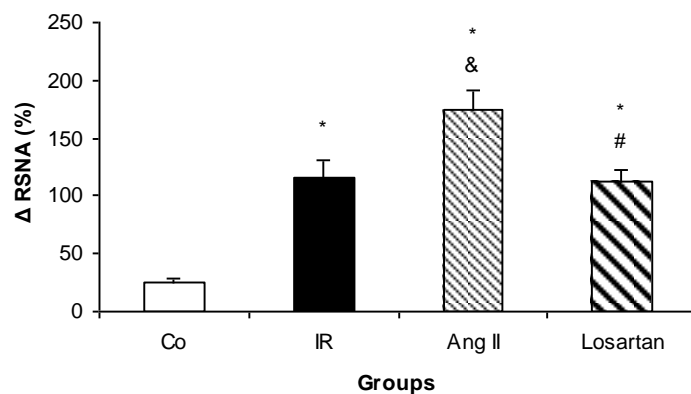
## یافته ها

**عملکرد کلیوی:** برای تعیین اینکه آیا عمل Ang II در هسته های PVN از طریق رسپتور های AT1 صورت می گیرد، لوزارتان که آنتاگونیست این گیرنده ها می باشد به داخل PVN تزریق شد. تزریق لوزارتان ۱۰ دقیقه قبل از تزریق ۳

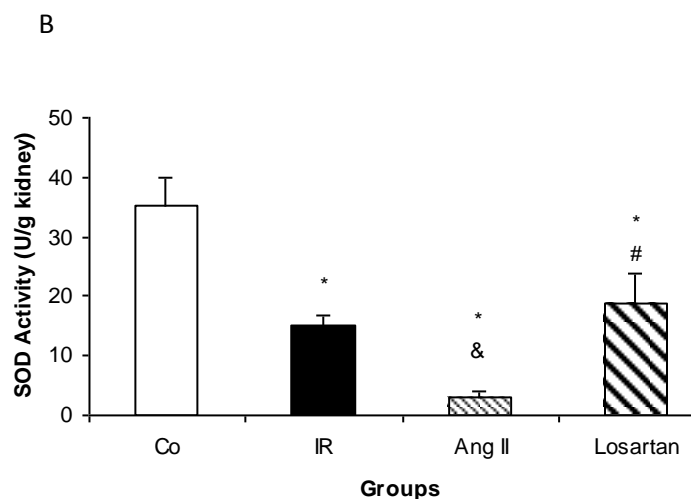
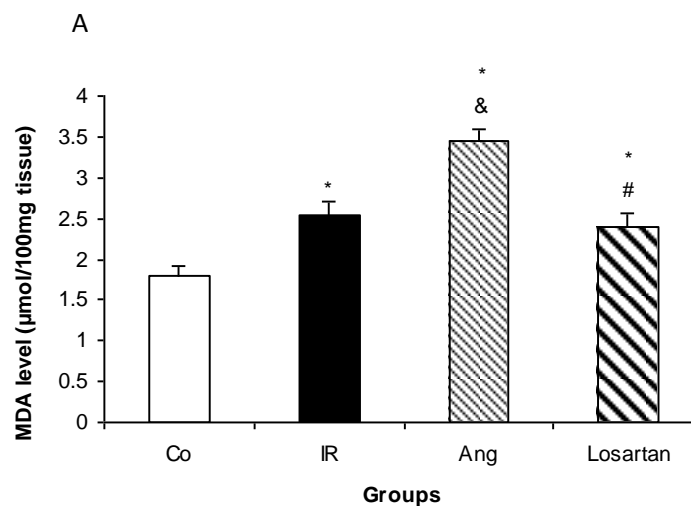
بررسی اثر تزریق لوزارتان (آنتاگونیست رسپتورهای AT1) بدخل PVN بر شاخص های



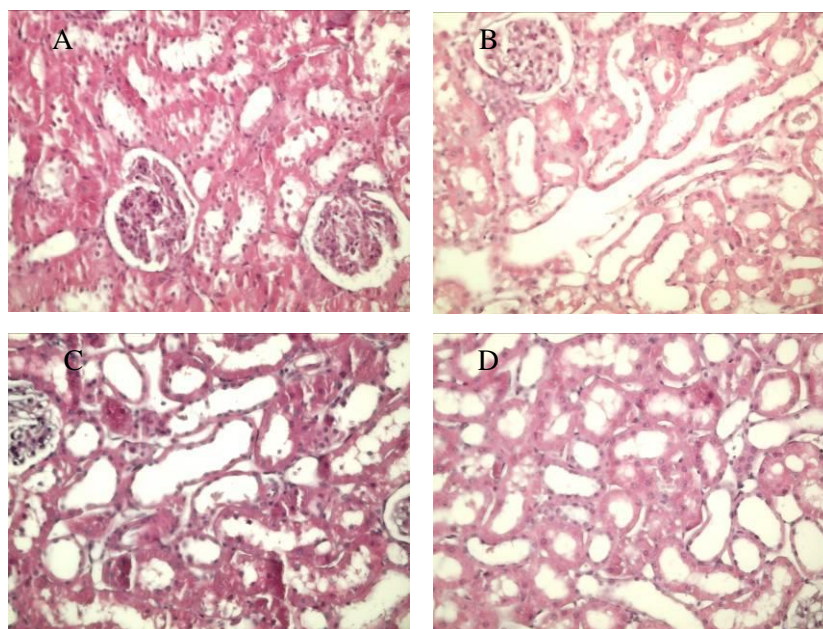
**شکل ۱-** بررسی اثر تزریق لوزارتان بدخل PVN بر کراتینین پلاسما (A)، BUN (B) و فعالیت NAG در ادرار (C). داده ها به صورت میانگین  $\pm$  میانگین خطای معیار نمایش داده شده است. \* اختلاف معنادار با گروه کنترل (Co) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. & اختلاف معنادار با گروه ایسکمی-رپرفیوژن (IR) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. # اختلاف معنادار با گروه آنژیوتانسین II (Ang) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد.



**شکل ۲-** بررسی اثر تزریق لوزارتان بدخل PVN بر در صد تغییرات فعالیت عصب سمپاتیک کلیوی. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  میانگین خطای معیار نمایش داده شده است. \* اختلاف معنادار با گروه کنترل (Co) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. & اختلاف معنادار با گروه ایسکمی-رپرپیوژن (IR) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. # اختلاف معنادار با گروه آنژیوتانسین II (Ang) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد.



**شکل ۳-** بررسی اثر تزریق لوزارتان بدخل PVN بر میزان MDA (A) و فعالیت SOD (B) در هسته پاراونتریکولار. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  میانگین خطای معیار نمایش داده شده است. \* اختلاف معنادار با گروه کنترل (Co) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. & اختلاف معنادار با گروه ایسکمی-رپرپیوژن (IR) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد. # اختلاف معنادار با گروه آنژیوتانسین II (Ang) را در سطح  $p < 0.05$  نشان می دهد.



شکل ۴- بررسی تزریق لوزارتان در PVN بر هیستولوژی کلیه، بزرگ نمایی:  $\times 400$   
A: گروه شپه، B: گروه ایسکمی-رپرفیوژن مجدد، C: گروه آنژیوتانسین II، D: گروه لوزارتان

### بررسی اثر تزریق لوزارتان بداخل PVN بر

#### فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی: برای تعیین

اینکه آیا سیستم سمپاتیک محیطی در اثرات Ang II در PVN در ایجاد آسیب ایسکمی کلیوی اثر دارد فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که درصد فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی در گروه آنژیوتانسین II در مقایسه با گروه فقط ایسکمی رپرفیوژن افزایش معنادار دارد ( $16/45 \pm 191/2$  درصد در گروه Ang II در مقایسه با  $15/84 \pm 125/16$  درصد در گروه ایسکمی-رپرفیوژن، شکل ۲،  $P < 0/05$ ). درصد فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی در گروه دریافت کننده لوزارتان بطور معناداری در مقایسه با گروه آنژیوتانسین II کاهش یافت ( $10/57 \pm 102/6$  درصد در گروه لوزارتان در مقایسه با  $16/45 \pm 191/2$  درصد در گروه Ang II، شکل ۲،  $P < 0/05$ ).

### بررسی اثر تزریق لوزارتان بداخل PVN بر

#### شاخص های استرس اکسیداتیو در PVN: غلظت

MDA و فعالیت آنزیم SOD در PVN بطور معناداری در گروه دریافت کننده Ang II به ترتیب افزایش و کاهش یافت (شکل ۳). تزریق لوزارتان منجر به کاهش معنادار غلظت MDA و افزایش معنادار فعالیت آنزیم SOD در مقایسه با گروه دریافت کننده Ang II شد (غلظت MDA  $0/15 \pm$

نانوگرم Ang II به داخل PVN و القای آسیب حاد کلیوی منجر به کاهش میزان کراتینین پلاسما و BUN شد (مقدار کراتینین  $1/33 \pm 0/08$  در گروه لوزارتان در مقایسه با  $0/30 \pm 2/02$  در گروه فقط ایسکمی رپرفیوژن و  $0/14 \pm 3/33$  میلی گرم در هر دسی لیتر در گروه دریافت کننده Ang II به میزان ۳ نانوگرم، شکل ۱A، و مقدار BUN  $18/54 \pm 104/66$  در گروه لوزارتان در مقایسه با  $23/24 \pm 125/71$  در گروه فقط ایسکمی رپرفیوژن و  $4/2 \pm 197/5$  میلی گرم در هر دسی لیتر در گروه دریافت کننده Ang II به میزان ۳ نانوگرم، شکل B،  $P < 0/05$ ).

بعد از جمع آوری ادرار ۲۴ ساعته فعالیت NAG ادراری نیز به عنوان شاخص زودرس آسیب توبولی اندازه گیری شد. تزریق یک طرفه Ang II به داخل PVN باعث افزایش معنادار فعالیت NAG ادراری در مقایسه با گروه کنترل شد (مقدار  $47/07 \pm 396/61$  در گروه آنژیوتانسین در مقایسه با  $71/38 \pm 221/16$  واحد در هر لیتر در گروه فقط ایسکمی-رپرفیوژن، شکل ۱C،  $P < 0/05$ ). لوزارتان توانست این افزایش را بطور معناداری کاهش دهد ( $20/88 \pm 240/61$  واحد در هر لیتر در گروه دریافت کننده لوزارتان در مقایسه با  $47/07 \pm 396/61$  واحد در هر لیتر در گروه دریافت کننده Ang II، شکل ۱C،  $P < 0/05$ ).

شواهدی دال بر رابطه بین سیستم عصبی سمپاتیک و نارسایی های کلیوی وجود دارد. Fujii و همکاران در مورد نقش سیستم عصبی سمپاتیک بر آسیب ایسکمی پرفیوژن کلیوی تاکید داشته اند [۸] و در مطالعه Masuo و همکاران نیز به بررسی نقش سیستم عصبی سمپاتیک در آسیب های کلیوی پرداخته شده است [۱۸]. در ضمن به عنوان یک نوروترانسمیتر مهم تحریمی، آنژیوتانسین II فعالیت عصب سمپاتیک در چندین ناحیه از مغز از جمله هیپوتالاموس را تنظیم می کند [۳۱]. با استفاده از ثبت از کل سلول در برش-های هیپوتالاموسی در موش های صحرایی، مشاهده شد که آنژیوتانسین II سبب القاء دپلاریزاسیون در نورون های نوع دو در هسته پاراونتریکولار می شود [۲]. Zheng و همکاران نشان دادند که در موش های صحرایی بیهوش مبتلا به نارسایی قلبی، افزایش تحریک در فعالیت عصب سمپاتیک کلیه با واسطه آنژیوتانسین وجود دارد [۳۱]. Llewellyn و همکاران نشان دادند که تحریک سمپاتیک با واسطه مکانیسم گلوتاماترژیک در هسته پاراونتریکولار، بخشی توسط فعالیت هسته پری اپتیک میانی یا اندام زیرفورنیکسی میانجیگری می شود [۱۷]. در مجموع، این شواهد از نتایج حاصل از این مطالعه که آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار سبب افزایش فعالیت عصب سمپاتیک کلیه می شود، حمایت می کند. یافته های ما نشان می دهد که اثر آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار بر تحریک عصب سمپاتیک ناشی از آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد، توسط رسپتورهای AT1 مرکزی میانجی گری می شود. مطالعات مربوط به آنژیوتانسین II و گیرنده های AT1 در این هسته، از این یافته ها حمایت می کند. آنژیوتانسین II، به عنوان یک نوروترانسمیتر معمول در سیستم عصبی مرکزی، پاسخ های ناشی از استرس را با تنظیم سیستم های سمپاتیک و نورواندوکرین میانجیگری می کند [۷]. AT1، گیرنده اصلی آنژیوتانسین II، واسطه سیگنال تحریمی آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار است [۱۶]. در موش های صحرایی طبیعی، این گیرنده در بخش پارووسلولار هسته پاراونتریکولار بیان می شود [۱۹] و بیان آن تحت شرایط استرس افزایش می یابد [۲۵]. ما مشاهده کردیم که تزریق آنتاگونیست گیرنده AT1 به هسته پاراونتریکولار، منجر به کاهش تحریک سمپاتیک گردید که بیشتر تایید کننده آنست

۲/۳۹۶ میکرومول در هر ۱۰۰ میلی گرم بافت مغز در گروه دریافت کننده لوزارتان در مقایسه با  $0/14 \pm 3/44$  میکرومول در هر ۱۰۰ میلی گرم بافت مغز در گروه Ang II، شکل ۳A،  $P < 0/05$  و فعالیت آنزیم  $3/14 \pm 45$  واحد در هر گرم بافت مغز در گروه دریافت کننده لوزارتان در مقایسه با  $1/43 \pm 33/25$  واحد در هر گرم بافت مغز در گروه Ang II، شکل ۳B،  $(P < 0/05)$ .

### بررسی اثر تزریق لوزارتان بداخل PVN بر

**میزان آسیب بافتی:** رنگ آمیزی مقاطع بافت کلیوی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) صورت گرفت و با میکروسکوپ نوری مشاهده و بررسی گردید. در بافت کلیوی گروه شم، علیرغم نفرتومی راست، ضایعه قابل ملاحظه ای در مقاطع بافتی کلیه چپ دیده نشد. بافت گروه IR، تغییرات قابل ملاحظه ای را نسبت به گروه شم نشان داد. این تغییرات شامل انهدام گسترده توبول ها، نکروز وسیع بخصوص در توبول های پروگزیمال، وجود انسداد توبولی قابل ملاحظه بویژه در توبول های انتهایی تر، کم شدن ضخامت سلول ها و تحت فشار بودن سلول های اپیتلیال توبولی می باشد. مقاطع بافتی در گروه دریافت کننده Ang II آسیب شدیدتری را در مقایسه با گروه IR نشان داد. با تجویز لوزارتان، از بروز تغییرات ناشی از پرفیوژن مجدد جلوگیری شد به نحوی که نکروز توبولی دیده نشده و رسوب مواد درون لومن توبول ها کمتر شده و اکثریت غالب مجاری باز هستند (شکل ۴).

## بحث

در مطالعه حاضر تزریق یک طرفه لوزارتان در هسته پاراونتریکولار، سبب بهبود وضعیت عملکردی و ساختاری کلیه، کاهش استرس اکسیداتیو در هسته پاراونتریکولار، کاهش فعالیت عصب سمپاتیک کلیوی ناشی از آنژیوتانسین II و به دنبال آن کاهش آسیب ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه شد. این نتایج نشان می دهد که هسته پاراونتریکولار، سایت پاسخگو در مغز است که آنژیوتانسین II در این هسته توسط رسپتورهای AT1 قادر است فعالیت عصب سمپاتیک کلیوی در آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد را تنظیم کند.



در RVLN و هسته پاراونتریکولار در پرفشاری ناشی از عروق کلیه مرتبط با افزایش استرس اکسیداتیو در این مناطق نقش دارد [۲۱]. این مشاهدات و نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آنژیوتانسین II بر نوروپاتی‌های هسته پاراونتریکولار عمل کرده و منجر به استرس اکسیداتیو و تحریک سمپاتیک می‌شود. یک مطالعه اخیر نشان داده است که تعامل بین گیرنده AT1 و NF- $\kappa$ B در هسته پاراونتریکولار در استرس اکسیداتیو و تحریک سمپاتیک توسط تعدیل نوروترانسمیترها در نارسایی قلبی مشارکت دارد [۳۰]. NADPH اکسیداز، به میزان زیادی در توسعه پرفشاری ناشی از آنژیوتانسین II حداقل بخشی از طریق هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس دخیل است [۲۷]. در مجموع، نتایج نشان می‌دهد که آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه و فعالیت بیش از حد عصب سمپاتیک کلیوی با افزایش استرس اکسیداتیو مرکزی همراه است.

پژوهش حاضر نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو در هسته پاراونتریکولار، ممکن است یکی از مکانیسم‌های تشدید تحریک سمپاتیک در آسیب ناشی از آنژیوتانسین II به هنگام وقوع ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه باشد و این عمل با واسطه رسپتورهای AT1 صورت می‌گیرد. بدین ترتیب تزریق آنژیوتانسین دو در هسته پاراونتریکولار باعث تشدید آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن می‌شود. به منظور درک بهتر تعادل بین استرس اکسیداتیو مرکزی و محیطی و مشارکت آن در آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیوی ناشی از آنژیوتانسین II، انجام بیشتر مطالعات منسجم و مولکولی پیشنهاد می‌شود.

## سپاسگزاری

این مقاله با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

که آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار، بر خروجی سمپاتیک موثر است. بنابراین منطقی است که آنژیوتانسین II ممکن است تنظیم کننده آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه با واسطه رسپتورهای AT1 در این هسته باشد. در این مطالعه، لوزارتان در هسته‌های پاراونتریکولار فقط اثرات مخرب آنژیوتانسین II مرکزی را بر آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مهار کرده است و نتوانسته است که آسیب ناشی از ایسکمی/پرفیوژن کلیوی را مهار نماید. ممکن بود که اگر لوزارتان بطور سیستمیک نه مرکزی تزریق می‌شد اثرات بهبود دهنده بر روی خود آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن نیز داشته باشد.

یکی از یافته‌های امیدوار کننده که در طول دهه گذشته پدیدار شد این است که تولید فیزیولوژیک گونه‌های واکنشی اکسیژن و فعال شدن آبشار سیگنالینگ وابسته به اکسیداسیون احیا زمینه اعمال آنژیوتانسین II را در اورگانهای مختلف فراهم می‌کند [۳]. Safari و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که لوزارتان میزان نسخه برداری ژن NADPH اکسیداز را به دنبال ایسکمی-پرفیوژن در میوکارد کاهش می‌دهد و بدینوسیله اثرات حفاظتی خود را مستقل از اثرات همودینامیکی خود اعمال می‌کند [۲۶]. شواهد نشان می‌دهد که ROS مرکزی در تنظیم فعالیت‌های قلبی عروقی و عملکرد شبکه‌های اتونوم مرکزی توسط آنژیوتانسین II اثرگذار است. به عنوان مثال، افزایش بیان SOD توسط وکتور آدنوویرال، از اثرات قلبی-عروقی تزریق آنژیوتانسین II به داخل بطن مغزی در موش سوری جلوگیری می‌کند [۳۲]. Gao و همکاران نشان دادند که در خرگوش طبیعی، NAD(P)H اکسیداز مشتق از ROS، هنگام درمان تحت مزمن آنژیوتانسین II اگزوزن به صورت مرکزی از طریق گیرنده‌های AT1، نقش مهمی در تعدیل فعالیت سمپاتیک و عملکرد بارورسپتورهای شریانی دارد [۱۰]. افزایش آنژیوتانسین II مرکزی، در تنظیم افزایشی گیرنده‌های AT1

## References

- [1] Braga VA, Medeiros IA, Ribeiro TP, Franca-Silva MS, Botelho-Ono MS, Guimaraes DD, Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. *Braz J Med Biol Res* 44 (2011) 871-876.
- [2] Cato MJ, Toney GM, Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices. *J Neurophysiol* 93 (2005) 403-413.
- [3] Chan SH, Chan JY, Angiotensin-Generated Reactive Oxygen Species in Brain and Pathogenesis of Cardiovascular Diseases. *Antioxid Redox Signal* 19 (2012) 1074-1084.
- [4] Cruz JC, Bonagamba LG, Machado BH, Biancardi VC, Stern JE, Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* 157 (2008) 463-472.
- [5] Esterbauer H, Cheeseman KH, Determination of aldehydic lipid peroxidation products :malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186 (1990) 407-421.
- [6] Fang F, Liu GC, Zhou X, Yang S, Reich HN, Williams V, Hu A, Pan J, Konvalinka A, Oudit GY, Scholey JW, John R, Loss of ACE2 exacerbates murine renal ischemia-reperfusion injury. *PLoS One* 8 (2013) e71433.
- [7] Ferguson AV, Washburn DL, Latchford KJ, Hormonal and neurotransmitter roles for angiotensin in the regulation of central autonomic function. *Exp Biol Med (Maywood)* 226 (2001) 85-96.
- [8] Fujii T, Kurata H, Takaoka M, Muraoka T, Fujisawa Y, Shokoji T, Nishiyama A, Abe Y, Matsumura Y, The role of renal sympathetic nervous system in the pathogenesis of ischemic acute renal failure. *Eur J Pharmacol* 481 (2003) 241-248.
- [9] Gao L, Li Y, Schultz HD, Wang WZ, Wang W, Finch M, Smith LM, Zucker IH, Downregulated Kv4.3 expression in the RVLM as a potential mechanism for sympathoexcitation in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298 (2010) H945-955.
- [10] Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH, Sympathoexcitation by central ANG II: roles for AT1 receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RVLM. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 (2005) H2271-2279.
- [11] Hirooka Y, Oxidative stress in the cardiovascular center has a pivotal role in the sympathetic activation in hypertension. *Hypertens Res* 34 (2011) 407-412.
- [12] Horak E, Hopfer SM, Sunderman FW, Jr., Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Clin Chem* 27 (1981) 1180-1185.
- [13] Kc P, Dick TE, Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir Physiol Neurobiol* 174 (2010) 55-64.
- [14] Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Ito K, Kishi T, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K, Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. *Circ Res* 96 (2005) 252-260.
- [15] Kopp UC, DiBona GF, Neural regulation of renin secretion. *Semin Nephrol* 13 (1993) 543-551
- [16] Li DP, Chen SR, and Pan HL, Angiotensin II stimulates spinally projecting paraventricular neurons through presynaptic disinhibition. *J Neurosci* 23 (2003) 5041-49.
- [17] Llewellyn T, Zheng H, Liu X, Xu B, Patel KP, Median preoptic nucleus and subfornical organ drive renal sympathetic nerve activity via a glutamatergic mechanism within the paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302 (2012) R424-432.
- [18] Masuo K, Lambert GW, Esler MD, Rakugi H, Ogihara T, Schlaich MP, The role of sympathetic nervous activity in renal injury and end-stage renal disease. *Hypertens Res* 33 (2010) 521-528.
- [19] McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FA, Chai SY, The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 35 (2003) 901-918.
- [20] Ogawa T, Mimura Y, Kaminishi M, Renal denervation abolishes the protective effects of ischaemic preconditioning on function and haemodynamics in ischaemia-reperfused rat kidneys. *Acta Physiol Scand*

- 174 (2002) 291-297.
- [21] Oliveira-Sales EB, Nishi EE, Carillo BA, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, Campos RR, Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens* 22 (2009) 484-492.
- [22] Paoletti F, Mocali A, Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD (P) H oxidation. *Methods Enzymol* 186 (1990) 209-220.
- [23] Peterson JR, Sharma RV, Davisson RL, Reactive oxygen species in the neuropathogenesis of hypertension. *Curr Hypertens Rep* 8 (2006) 232-241.
- [24] Pfister J, Spengler C, Grouzmann E, Raizada MK, Felix D, Imboden H, Intracellular staining of angiotensin receptors in the PVN and SON of the rat. *Brain Res* 754 (1997) 307-310.
- [25] Saavedra JM, Benicky J, Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress* 10 (2007) 185-193.
- [26] Safari F, Hajizadeh S, Moshtaghion S, Forouzandeh Moghadam M, Shekarforoush S, Bayat G, Mazlum R, Sattarian L, Effect of losartan on NOX2 transcription following acute myocardial ischemia-reperfusion. *Physiol Pharmacol* 16 (2012) 44-53.
- [27] Wang G, Coleman CG, Chan J, Faraco G, Marques-Lopes J, Milner TA, Guruju MR, Anrather J, Davisson RL, Iadecola C, Pickel VM, Angiotensin II slow-pressor hypertension enhances NMDA currents and NOX2-dependent superoxide production in hypothalamic paraventricular neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304 (2013) R1096-1106.
- [28] Wright JW, Harding JW, Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res* 17 (1992) 227-262.
- [29] Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K, Vincent JL, Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature. *Am J Med* 118 (2005) 827-832.
- [30] Yu XJ, Suo YP, Qi J, Yang Q, Li HH, Zhang DM, Yi QY, Zhang J, Zhu GQ, Zhu Z, Kang YM, Interaction Between AT1 Receptor and NF-kappaB in Hypothalamic Paraventricular Nucleus Contributes to Oxidative Stress and Sympathoexcitation by Modulating Neurotransmitters in Heart Failure. *Cardiovasc Toxicol* 13 (2013) 381-390.
- [31] Zheng H, Li YF, Wang W, Patel KP, Enhanced angiotensin-mediated excitation of renal sympathetic nerve activity within the paraventricular nucleus of anesthetized rats with heart failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297 (2009) R1364-1374.
- [32] Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL, Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91 (2002) 1038-1045.
- [33] Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL, Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res* 95 (2004) 210-216.