

اثرات وابسته به دوز سولفیدهیدروژن بر آسیب حاد کلیوی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه در موش صحرائی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۰ ویرایش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۷ آنلاین: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸

زمینه و هدف: آسیب حاد ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد در کلیه یک پدیده شایع کلینیکی است. سولفیدهیدروژن به‌عنوان مدیاتور درون‌ساز باعث بهبود آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد می‌شود. این ماده در دوزهای متفاوت اثرات متضادی دارد. این مطالعه اثر دوزهای مختلف آن را بر آسیب ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه بررسی می‌کند. **روش بررسی:** پژوهش کنونی از نوع مطالعه تجربی در حیوانات است و در فروردین ۱۳۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید. رت‌های نر نژاد ویستار در پنج گروه دسته‌بندی شدند. در گروه شام ایسکمی القا نشد. در گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد ۵۵ دقیقه ایسکمی در پدیکل هر دو کلیه و سپس ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد القا شد. در سه گروه درمان، دهنده سولفیدهیدروژن به‌میزان ۵۰، ۷۵، ۱۲۵ $\mu\text{mol/kg}$ به‌صورت داخل صفاقی ۱۰ دقیقه پیش از ایسکمی و بلافاصله در شروع پرفیوژن مجدد تزریق شد. در انتهای ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد، پلازما جهت بررسی عملکرد کلیه جمع‌آوری شد.

یافته‌ها: میزان نیتروژن اوره خون و کراتینین پلازما در گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد نسبت به گروه شام افزایش یافت. سولفید هیدروژن سدیم در دوزهای ۵۰ و ۷۵ μmol باعث کاهش نیتروژن اوره خون و کراتینین و بهبود عملکرد کلیه شد اما در دوز ۱۲۵ μmol سبب افزایش نیتروژن اوره خون و کراتینین پلازما و آسیب بیشتر کلیوی نسبت به گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد شد.

نتیجه‌گیری: سولفیدهیدروژن در دوزهای کمتر باعث بهبود عملکرد کلیه و در دوزهای بالاتر اثرات تخریبی دارد. بنابراین تعیین میزان دوز درمانی سولفیدهیدروژن در جلوگیری از آسیب ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه از اهمیت زیادی برخوردار است.

کلمات کلیدی: سولفید هیدروژن، ایسکمی، کلیه‌ها، پرفیوژن مجدد.

فاطمه عزیزی
بهجت سیفی*
مهری کدخدایی

گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان انقلاب، خیابان ۱۶ آذر، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

تلفن: ۰۲۱-۶۴۰۵۳۲۸۸

E-mail: b-seifi@tums.ac.ir

مقدمه

End stage renal disease (ESRD) به‌شمار می‌رود، آسیب ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه اجتناب‌ناپذیر است^۱ و باعث عملکرد تاخیری عضو پیوندی می‌شود. این امر خطر پس زدن حاد پیوند را بالا می‌برد و تاثیر سویی بر عملکرد طولانی‌مدت عضو پیوندی دارد.^۲ در سال‌های اخیر با وجود تلاش‌های فراوان، مداخلات جدیدی به‌جز درمان‌های حمایتی برای درمان آسیب حاد کلیه در دسترس نیست و تلاش برای دستیابی به درمان موثر ضروری است.^۳ یکی از روش‌های حفاظتی مطرح، آماده‌سازی ایسکمیک (Ischemic conditioning)

در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی برای یافتن راه‌های درمانی موثر جهت محدود کردن آسیب‌های ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیوی انجام شده است. این آسیب که به‌دنبال کاهش ناگهانی جریان خون کلیه اتفاق می‌افتد،^۱ به‌طور معمول به‌دنبال پیوند کلیه، جراحی‌های قلب و عروق، شوک هیپوولومیک و تروما ایجاد می‌شود.^۲ از سوی دیگر در پیوند کلیه که درمانی موثر برای بیماران

استانداردهای کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تهران به گونه‌ای رعایت شد که در صورت امکان موجب درد و رنج حیوان نگردد.

همه حیوانات مورد مطالعه با تزریق داخل صفاقی کتامین (100 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بیهوش شدند. محل جراحی (روی شکم) پس از برطرف کردن موها، با بتادین ضدعفونی شد. فشارخون سیستولیک توسط روش Tail cuff مانیتور شد. حیواناتی که دچار افت فشارخون تا میزان 60 mmHg می‌شدند از مطالعه حذف گردیدند.

حیوانات به‌طور تصادفی به پنج گروه شش تایی (1 شم، 2) ایسکمی، (3) سولفیدهیدروژن (50، 4) سولفیدهیدروژن 75 و (5) سولفیدهیدروژن 125 تقسیم شدند. در گروه شم پس از ضدعفونی ناحیه جراحی برش عمودی در قسمت میانی شکم داده شد و پدیکل‌های هر دو کلیه در معرض دید قرار گرفتند. بافت‌های اطراف شریان‌های کلیه جدا شد اما ایسکمی القا نشد. برای القای ایسکمی در گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد، با استفاده از دو کلمپ بولداگ به مدت 55 دقیقه پدیکل هر دو کلیه به‌صورت همزمان مسدود شد و پس از آن 24 ساعت پرفیوژن مجدد برقرار گردید.

در گروه‌های دریافت‌کننده سولفیدهیدروژن، NaHS (Sodium hydrosulfide) (به‌عنوان دهنده سولفیدهیدروژن) تهیه شده از Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany ده دقیقه پیش از القای ایسکمی و همچنین در شروع پرفیوژن مجدد به ترتیب به میزان 0.50، 0.75، 1.25 $\mu\text{mol/kg}$ به‌صورت داخل صفاقی تجویز شد. دوز سولفیدهیدروژن موردنظر در 0.5 ml آب حل شد و بلافاصله پس از تهیه تزریق شد. سپس محل برش جراحی توسط نخ (4-0 silk (Ethicon Inc., Somerville, NJ, USA) دوخته شد و حیوانات به مدت 24 ساعت در قفس‌های مجزای نگهداری شدند. در تمام نمونه‌ها خونگیری از ورید اجوف تحتانی انجام شد. شاخص‌های عملکردی کلیه (کراتینین و نیتروژن اوره خون) با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد.

آنالیز داده‌ها با استفاده از SPSS software, version 16 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام گردید. داده‌ها به‌صورت Mean \pm S.E.M. ارائه شد و آنالیز آماری توسط Two-way analysis of variance (ANOVA) با Tukey's test انجام گرفت. $P < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان کراتینین پلازما در گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد نسبت به

است. در این روش دوره‌های کوتاه مدت ایسکمی غیر آسیب‌رسان سبب حفاظت ارگان‌ها در برابر دوره‌های طولانی ایسکمی آسیب‌رسان می‌شود.⁶ بدیهی است که استفاده از داروها می‌تواند ما را از این روش‌های تهاجمی بی‌نیاز کند. مطالعاتی که در دهه گذشته انجام شده است نشان می‌دهد که افزون بر نیتریک‌اکساید و مونوکسید کربن، سولفیدهیدروژن (H₂S) سومین ترانسمیتر گازی است که در تنظیم عملکردهای فیزیولوژیک متعددی نقش دارد.⁷ سولفیدهیدروژن به‌وسیله آنزیم Cystathionine β -synthase (CBS) و Cystathionine γ -lyase (CSE) از ال-سیستین یا ال-هموسیستین ساخته می‌شود.⁸ سولفیدهیدروژن دارای اثرات آنتی‌اکسیداتیو و ضدالتهاب است و می‌تواند روزه‌ای به‌سوی درمان‌های موثرتر برای آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه باشد.^{9,10}

مطالعات نشان می‌دهد سولفیدهیدروژن می‌تواند اثرات دوگانه‌ای داشته باشد. فاکتورهای مختلفی در تعیین این‌که بتواند نقش ضدالتهابی یا پیش‌التهابی داشته باشد دخیل است. غلظت و روش تجویز ممکن است در تعیین اثرات متضاد التهابی موثر باشد. سولفیدهیدروژن در غلظت پایین اثر ضدالتهابی و در غلظت بالا اثرات پیش‌التهابی را از خود نشان می‌دهد، اما این امر در همه موارد صدق نمی‌کند. روش تجویز ممکن است نتیجه حاصله را تحت تاثیر قرار دهد. حتی پیشنهاد شده است که این ماده در غلظت‌های یکسان می‌تواند اثرات متضادی را که وابسته به سرعت رهایش آن است از خود نشان دهد.¹¹ هدف این مطالعه بررسی اثرات دوزهای متفاوت سولفیدهیدروژن بر تغییرات عملکردی کلیه پس از القای ایسکمی-پرفیوژن مجدد دوطرفه بود.

روش بررسی

پژوهش کنونی از نوع مطالعه تجربی در حیوانات بود و در فروردین 1393 در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید. 18 سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 250-300 g به‌طور تصادفی انتخاب شدند. رت‌ها در دمای استاندارد و در شرایط محیطی 12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی نگهداری شده و در تمام دوره آزمایش دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. مسایل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مانند بیهوشی به‌هنگام جراحی بر اساس

جدول ۱: اثر دوزهای مختلف سولفیدهیدروژن سدیم بر میزان نیتروژن اوره خون در پلاسما و کراتینین پلاسما

گروه شم	گروه ایسکمی	گروه سولفیدهیدروژن سدیم با دوز ۵۰ μmol/kg	گروه سولفیدهیدروژن سدیم با دوز ۷۵ μmol/kg	گروه سولفیدهیدروژن سدیم با دوز ۱۲۵ μmol/kg
نیتروژن اوره خون (mg/dl)	۱۹ ± ۰/۳۶	۱۰۶/۶ ± ۹/۰۶	۵۶/۵ ± ۸/۰۱	۵/۷۱ ± ۱۲/۹۸
کراتینین پلاسما (mg/dl)	۰/۰ ± ۵/۰۲	۱/۰ ± ۸/۱۶	۰/۸۸ ± ۰/۰۴	۰/۹۵ ± ۰/۶۷

مختلف اثرات دوگانه‌ای را برای سولفیدهیدروژن گزارش کرده‌اند. Wang و همکاران گزارش کرده‌اند که سولفیدهیدروژن در غلظت پایین اثر ضدالتهاپی و در غلظت بالا اثرات پیش‌التهاپی از خود نشان می‌دهد.^{۱۱} در پژوهش کنونی تاثیرات سه دوز مختلف سولفیدهیدروژن سدیم به‌عنوان دهنده سولفیدهیدروژن بر عملکرد کلیوی بررسی شد و نشان داد که دوزهای بالاتر سولفیدهیدروژن سدیم می‌تواند اثرات سمی و مخربی داشته باشد، درحالی‌که دوزهای پایین‌تر می‌تواند باعث بهبود عملکرد کلیوی شود. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان نیتروژن اوره خون و کراتینین در گروه دریافت‌کننده سولفید هیدروژن سدیم با دوز بیشتر (۱۲۵ μmol/kg) نسبت به گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد افزایش معناداری یافته است. این امر اثرات مخرب سولفیدهیدروژن را در دوزهای بالاتر نشان می‌دهد.

Qu و همکاران دریافتند تجویز سولفیدسدیم به‌عنوان دهنده سولفیدهیدروژن باعث افزایش چشمگیری در حجم انفارکتوس مغزی پس از انسداد شریان مغز میانی می‌شود.^{۱۳} در این مطالعه مشاهده شد که سولفیدهیدروژن در دوز کم به‌عنوان روشی جهت کاهش آسیب ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد می‌تواند سبب اثرات حفاظتی به‌صورت کاهش معنادار غلظت کراتینین و نیتروژن اوره خون در گروه‌های دریافت‌کننده سولفیدهیدروژن با دوز کمتر (۵۰ و ۷۵ μmol/kg) در مقایسه با گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد شود. Hunter, Tripatara و همکارانشان توانستند با استفاده از سولفیدهیدروژن عملکرد کلیه را بهبود بخشند.^{۱۴} مکانیسم دقیق اثرات حفاظتی سولفیدهیدروژن که مانع از آسیب کلیوی می‌شود معلوم نیست اما پژوهش‌ها پیشنهاد می‌کنند سولفیدهیدروژن با دوز کم در پستانداران دارای اثرات ضدالتهاپ، ضدآپوپتوز، وازودیلاتور، گشادکننده عروق و حفاظت‌کننده میتوکندریایی است.^{۱۵} مکانیسم مطرح دیگر تاثیر سولفیدهیدروژن بر کاهش استرس اکسیداتیو می‌باشد. میزان

گروه شم افزایش معناداری را نشان داد (۱/۸±۰/۱۶) در مقایسه با ۰/۰±۵/۰۲ mg/dl، P=۰/۰۱۹. سولفیدهیدروژن سدیم با دوز ۵۰ و ۷۵ μmol/kg توانست میزان کراتینین را نسبت به گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد به‌طور معناداری کاهش دهد (۰/۸۸±۰/۰۴ و ۰/۹۵±۰/۶۷). در مقایسه با ۱/۸±۰/۱۶ mg/dl، P=۰/۰۰۱. درحالی‌که سولفیدهیدروژن سدیم با دوز ۱۲۵ میکرومول به‌ازای هر کیلوگرم از وزن بدن منجر به افزایش معنادار کراتینین پلاسما در مقایسه با گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد شد (۳±۰/۲۱) در مقایسه با ۱/۸±۰/۱۶ mg/dl، P=۰/۰۱۵ (جدول ۱). در گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد نسبت به گروه شم میزان نیتروژن اوره خون در پلاسما افزایش معناداری را نشان داد (۹/۰۶ ± ۱۰۶/۶) در مقایسه با ۱۹ ± ۰/۳۶ mg/dl، P=۰/۰۱۹. سولفیدهیدروژن سدیم با دوز ۵۰ و ۷۵ μmol/kg توانست میزان نیتروژن اوره خون در پلاسما را نسبت به گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد به‌طور معناداری کاهش دهد (۵۶/۵ ± ۸/۰۱ و ۷۱/۵ ± ۱۲/۹۸) در مقایسه با ۱۰۶/۶ ± ۹/۰۶ mg/dl، P=۰/۰۰۱. درحالی‌که سولفیدهیدروژن سدیم با دوز ۱۲۵ μmol/kg منجر به افزایش معنادار نیتروژن اوره خون در پلاسما در مقایسه با گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد شد (۱۵۸ ± ۹/۹۶) در مقایسه با ۱۰۶/۶ ± ۹/۰۶ mg/dl، P=۰/۰۰۴ (جدول ۱).

بحث

افزایش غلظت نیتروژن اوره خون و کراتینین در گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد نسبت به گروه شم کاهش عملکرد کلیوی را در گروه ایسکمی-پرفیوژن مجدد نشان می‌دهد. سولفیدهیدروژن دارای اثرات آنتی‌اکسیداتیو و ضدالتهاپ است و می‌تواند روزه‌ای به‌سوی درمان‌های موثرتر برای آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه باشد.^{۱۶} اما مطالعات

متضادی را بر آسیب حاد کلیوی اعمال می‌کند. بنابراین تعیین میزان دوز درمانی برای این میانجی‌گازی جدید از اهمیت زیادی برخوردار است. *سپاسگزاری:* این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی اثر سولفید هیدروژن بر آسیب حاد کلیوی ناشی از ایسکمی-پرفیوژن مجدد در موش صحرایی نر" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۳ و کد ۹۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

نیترژن اوره خون و کراتینین در گروه دریافت‌کننده سولفید هیدروژن با دوز بیشتر ($125 \mu\text{mol/kg}$) نسبت به گروه‌های دریافت‌کننده سولفید هیدروژن با دوز کمتر افزایش معناداری را نشان داده است، در حالی که بین گروه‌های دریافت‌کننده سولفید هیدروژن با دوز کمتر ($50 \mu\text{mol/kg}$) و تفاوت معناداری وجود نداشت. نتایج این مطالعه به این موضوع اشاره دارد که تجویز سولفید هیدروژن با دوزهای متفاوت اثرات

References

1. Regner KR, Roman RJ. Role of medullary blood flow in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21(1):33-8.
2. Hassoun HT1, Grigoryev DN, Lie ML, Liu M, Cheadle C, Tuder RM, et al. Ischemic acute kidney injury induces a distant organ functional and genomic response distinguishable from bilateral nephrectomy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(1):F30-40.
3. Yun Y, Duan WG, Chen P, Wu HX, Shen ZQ, Qian ZY, et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 is involved in ischemic postconditioning protection against renal ischemia reperfusion injury in rats. *Transplant Proc* 2009;41(9):3585-9.
4. Tan S, Wang G, Guo Y, Gui D, Wang N. Preventive Effects of a Natural Anti-Inflammatory Agent, Astragaloside IV, on Ischemic Acute Kidney Injury in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;ID:284025.
5. Hunter JP, Hosgood SA, Patel M, Rose R, Read K, Nicholson ML. Effects of hydrogen sulphide in an experimental model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 2012;99(12):1665-71.
6. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74(5):1124-36.
7. Beltowski J. Hypoxia in the renal medulla: implications for hydrogen sulfide signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334(2):358-63.
8. Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PT. Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int* 2008;52(1-2):155-65.
9. Liu H, Bai XB, Shi S, Cao YX. Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Pharm Pharmacol* 2009;61(2):207-12.
10. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(39):15560-5.
11. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 2012;92(2):791-896.
12. Aktoz T, Aydogdu N, Alagol B, Yalcin O, Huseyinova G, Atakan IH. The protective effects of melatonin and vitamin E against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ren Fail* 2007;29(5):535-42.
13. Qu K, Chen CP, Halliwell B, Moore PK, Wong PT. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke* 2006;37(3):889-93.
14. Tripatara P, Patel NS, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, et al. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Lab Invest* 2008;88(10):1038-48.
15. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 1996;16(3):1066-71.
16. DU JT, Li W, Yang JY, Tang CS, Li Q, Jin HF. Hydrogen sulfide is endogenously generated in rat skeletal muscle and exerts a protective effect against oxidative stress. *Chin Med J (Engl)* 2013;126(5):930-6.

Different dose-dependent effects of hydrogen sulfide on ischemia-reperfusion induced acute kidney injury in rats

Fateme Azizi M.Sc. Student
Behjat Seifi Ph.D.*
Mehri Kadkhodae Ph.D.

Department of Physiology, School
of Medicine, Tehran University of
Medical Sciences, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Department of
Physiology, School of Medicine, Tehran
University of Medical Sciences, Poursina
St., 16th Azar St., Enghelab St., Tehran,
Iran.
Tel: +98 21 64053288
E-mail: b-seifi@tums.ac.ir

Abstract

Received: 01 Aug. 2017 Revised: 29 Nov. 2017 Accepted: 08 Dec. 2017 Available online: 09 Dec. 2017

Background: Renal ischemia reperfusion (RIR) injury is a common clinical syndrome that affects renal function and significantly increases morbidity and mortality. Hydrogen sulfide (H₂S) is an endogenously gaseous mediator that exhibits many cytoprotective effects. Recently, studies have shown that H₂S have opposite effects in different doses. Therefore, in the current study we investigated the effects of H₂S at different doses on renal function after induced renal ischemia reperfusion injury model.

Methods: The present study is an experimental study in animals and was conducted in Tehran University of Medical Sciences in April 2014. Male Wistar rats were assigned to five main groups (n= 6): 1) Sham, 2) Ischemia reperfusion (IR), 3) Administration of 50 µmol/kg Sodium hydrosulfide (NaHS)+IR, 4) Administration of 75 µmol/kg NaHS+IR and 5) Administration of 125 µmol/kg NaHS+IR. Sham group underwent laparotomy without cross-clamping of renal pedicles. Renal ischemia (IR) was induced in rats by both renal arteries occlusion for 55 min followed by reperfusion. Rats in the NaHS groups received intraperitoneal injections of 50, 75, or 125 µmol/kg of NaHS 10 minutes before the onset of ischemia and immediately after the onset of reperfusion. After reperfusion, plasma was collected for functional evaluation.

Results: Compared to the sham, IR animals demonstrated a significant rise in plasma creatinine and BUN levels. Rats in the low-dose NaHS treated groups (H50, H75) had improved renal function by significantly decrease of creatinine and BUN levels. However, treatment with a high-dose of NaHS increased the levels of plasma creatinine and BUN levels as compared with these indices in the IR group.

Conclusion: Our study demonstrates that different doses of Sodium hydrosulfide (NaHS) can play diverse role in renal ischemia reperfusion injury. However, NaHS in the low-doses could protect the kidney from the RIR injury, in a higher dose NaHS exaggerated the renal function by increases plasma creatinine and BUN. Therefore, determining of the therapeutic doses of NaHS may be important in the protection of kidney from the RIR injury.

Keywords: hydrogen sulfide, ischemia, kidneys, reperfusion.