

## اثر آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار در تشدید آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه

## چکیده

دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۰۵ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۳ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۱/۱۰

**زمینه و هدف:** فعالیت عصب سمپاتیک در نارسایی کلیوی افزایش می‌یابد و هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس محل مرکزی مهمی برای فعالیت عصب سمپاتیک است. در ضمن این هسته محتوی گیرنده‌های آنژیوتانسین II نیز می‌باشد. هدف این مطالعه بررسی اثرات آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس در آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه و ارزیابی فعالیت عصب سمپاتیک کلیه (RSNA) Renal Sympathetic Nerve Activity بود.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۱ در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفته است، در این مطالعه یک هفته پیش از القای ایسکمی پرفیوژن مجدد کلیه در موش‌های صحرایی نر نژاد Sprague-Dawley، کانولی در هسته پاراونتریکولار راست به منظور تزریق آنژیوتانسین II (۳، ۳۰ و ۳۰۰ نانوگرم) تعبیه گردید. سپس نفرکتومی راست انجام شد، یک هفته بعد آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه توسط کلامپ کردن شریان کلیوی چپ به مدت ۴۵ دقیقه و پرفیوژن مجدد به مدت سه یا ۲۴ ساعت القاء شد. میزان آسیب کلیوی، فعالیت عصب سمپاتیک کلیه و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در هسته پاراونتریکولار ارزیابی شدند.

**یافته‌ها:** تزریق دوزهای فارماکولوژیک آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار، منجر به تشدید آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه به صورت افزایش در میزان کراتینین پلاسما و BUN ( $P < 0.05$ ) و بدتر شدن وضعیت بافتی کلیه شد. با افزایش دوز آنژیوتانسین II وضعیت عملکردی و بافتی کلیه بدتر شد. افزایش RSNA و فعالیت آنزیم سوپر اکسیددسموتاز و سطح مالون دی‌آلدهید در هسته پاراونتریکولار ( $P > 0.05$ ) نیز با افزایش میزان دوز آنژیوتانسین II به وقوع پیوست.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که هسته پاراونتریکولار در آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه، محلی پاسخگو در آسیب ناشی از آنژیوتانسین II مرکزی، محسوب می‌گردد. ما پیشنهاد می‌کنیم که اثرات مرکزی آنژیوتانسین II با اثر بر استرس اکسیداتیو در این هسته و اثر بر سیستم عصبی سمپاتیک محیطی واسطه‌گری می‌شود.

**کلمات کلیدی:** کلیه، ایسکمی، آسیب پرفیوژن مجدد، آنژیوتانسین II، هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس، سیستم عصبی سمپاتیک.

بهجت سیفی<sup>۱\*</sup>، مهری کلخدایی<sup>۱</sup>  
عنایت‌اله بخشی<sup>۲</sup>، مینا رنجبران<sup>۱</sup>  
پریسا احقری<sup>۳</sup>، بهاره یثربی<sup>۴</sup>

۱- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۲- گروه کامپیوتر و آمار حیاتی، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران. ۳- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، پردیس بین‌الملل، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۴- مرکز طبی کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: تهران، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی. تلفن: ۰۲۱-۶۴۰۵۳۲۸۸  
E-mail: b-seifi@tums.ac.ir

## مقدمه

سمپاتیک کلیوی نقش مهمی در تنظیم حجم مایعات بدن و فشار خون از طریق تنظیم عملکرد کلیه بازی می‌کند.<sup>۱</sup> فعالیت عصب و ابران سمپاتیک کلیه به‌طور قابل توجهی در تنظیم جریان خون کلیوی، میزان تصفیه گلوامرولی، انتقال آب و مواد محلول از سلول‌های

نارسایی ایسکمیک حاد کلیه، یک سندرم بالینی شایع با عوارض مرگ و میر بالاست. کلیه‌ها به وفور عصب‌دهی شده و عصب

آنژیوتانسین II آگزوژن به صورت مرکزی از طریق گیرنده‌های AT1، نقش مهمی در تعدیل فعالیت سمپاتیک و عملکرد بارورسپتورهای شریانی دارد.<sup>۱۳</sup> این امر که آنژیوتانسین II می‌تواند از طریق تولید ROS در هسته پاراونتریکولار، در آسیب ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه موثر باشد، ناشناخته باقی می‌ماند.

بنابراین، ما با تزریق مستقیم آنژیوتانسین II به هسته پاراونتریکولار، به بررسی تاثیر دوزهای مختلف آن، در آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه در موش صحرایی پرداخته و فرض کردیم که آنژیوتانسین II ممکن است با تحریک تولید ROS در هسته پاراونتریکولار و با افزایش دادن جریان خروجی سمپاتیک منجر به بدتر کردن وضعیت کلیوی در آسیب ایسکمی رپرفیوژن گردد.

## روش بررسی

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۱ در گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام پذیرفته است، در این مطالعه از موش‌های نر نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ 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. پروتکل‌های آزمایش و روش مراقبت از حیوانات در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران مورد تایید قرار گرفت.

یک هفته قبل از القای ایسکمی - رپرفیوژن کلیوی، همه موش‌های صحرایی نر بعد از بیهوشی با پنتوباریتال (۵۰ mg/kg)، داخل صفاقی در دستگاه استروتاکس قرار داده شده و هسته پاراونتریکولار سمت راست کانوله شد. مختصات مربوط به این ناحیه عبارتند از: ۱/۵ mm پشت برگما، ۰/۴ mm در کنار خط وسط و ۷/۷-۷/۸ mm عمق هسته. سپس کلیه سمت راست از طریق یک برش کوچک در پهلو برداشته شد. پس از سپری شدن یک هفته دوره بهبودی، موش‌ها در گروه‌های زیر قرار داده شدند: ۱- گروه شم، ۲- ایسکمی پرفیوژن مجدد (IR)، ۳- تزریق آنژیوتانسین دو پیش از القاء ایسکمی (۳، ۳۰ و ۳۰۰ نانوگرم). در همه حیوانات شریان فمور سمت راست برای ثبت فشارخون شریانی کانوله شد. فشارخون شریانی به‌طور مداوم از قبل و در طول ایسکمی مانیتور شد. به منظور

اپیتلیال توپول کلیوی، حمل و نقل آب و ترشح هورمونی مشارکت دارد. اعصاب آوران کلیه سبب فعال شدن سیستم عصبی سمپاتیک مرکزی شده و در سیستم کنترل رفلکس از طریق رفلکس کلیوی - کلیوی مشارکت می‌کند.<sup>۲</sup>

اعصاب کلیه ارتباط بین سیستم اعصاب مرکزی و کلیه‌ها است. در پاسخ به ورودی‌های چندگانه مرکزی و محیطی، فعالیت عصب و ابران سمپاتیک کلیوی به‌منظور انتقال اطلاعات به کلیه تغییر می‌کند. در شرایط پاتوفیزیولوژیک، تنظیم غیرطبیعی فعالیت عصب و ابران سمپاتیک کلیه، به‌طور قابل توجهی در اختلال عملکرد کلیه مشارکت دارد.<sup>۳</sup> فعالیت عصب سمپاتیک در بیماران و حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به نارسایی کلیوی افزایش می‌یابد در حالی که قطع عصب کلیوی اثرات محافظتی در برابر نارسایی کلیه در حیوانات و انسان نشان می‌دهد.<sup>۴</sup> با توجه به ارتباط بین سیستم عصبی سمپاتیک کلیه و ایسکمی پرفیوژن مجدد ناشی از نارسایی حاد کلیه، در یک مطالعه گزارش شد که قطع عصب کلیوی قبل از وقوع ایسکمی، ریت فیلتراسیون گلومرولی کاهش یافته پس از ایسکمی پرفیوژن مجدد را تقلیل می‌دهد.<sup>۵</sup>

هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس مرکز مهم در فعالیت عصب سمپاتیک است.<sup>۶</sup> این هسته هم‌چنین محتوی سلول‌های واکنشی ایمنی، فیبرها و گیرنده‌های آنژیوتانسین دو (Ang II) می‌باشد.<sup>۷</sup> دو نوع گیرنده Ang II به نام AT1 و AT2 وجود دارد. تراکم بالای گیرنده‌های AT1 در نورون‌های هسته پاراونتریکولار یافت شده است.<sup>۸</sup> گزارشی مبنی بر عمل TNF- $\alpha$  از طریق گیرنده AT1 هسته پاراونتریکولار و مشارکت آن در تحریک سمپاتیک در هنگام نارسایی قلبی وجود دارد.<sup>۹</sup>

در بیماری‌های قلبی عروقی وابسته به آنژیوتانسین دو مغزی، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده توسط Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) زنجیره انتقال الکترون میتوکندری و سایتوکین‌های پیش التهابی، سبب افزایش فعالیت عصبی و خروجی سمپاتیک می‌شوند.<sup>۱۰</sup> NAD(P)H اکسیداز مشتق از ROS، واسطه‌ای مهم در سیگنالینگ آنژیوتانسین II محسوب می‌شود.<sup>۱۱</sup> نشان داده شده است که افزایش آنژیوتانسین II مرکزی، سبب افزایش جریان خروجی سمپاتیک می‌شود. Gao نشان داد که در خرگوش طبیعی، NAD(P)H اکسیداز، هنگام استفاده مزمن

القاء نارسایی حاد ایسکمیک کلیه، موش‌ها با استفاده از پتوباریتال (۵۰ mg/kg، به صورت داخل صفاقی) بیهوش شده و کلیه چپ از طریق یک برش کوچک در پهلو آشکار گردید. شریان کلیوی چپ توسط یک کلامپ به مدت ۴۵ دقیقه مسدود و به دنبال آن به مدت ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد برقرار شد. در گروه شم فقط شریان کلیوی چپ نمایان شد و مسدود نگردید. در گروه‌های دریافت‌کننده آنژیوتانسین، تزریق آنژیوتانسین دو (در دوزهای ۳، ۳۰ و ۳۰۰ نانوگرم در حجم ۳۰۰ نانولیتزر سالین)، از طریق یک کانول تزریق که توسط رابط پلی‌اتیلنی به سرنگ هامیلتون متصل بود، صورت گرفت. تزریق به مدت ۳۰ ثانیه به طول انجامید و به منظور جلوگیری از جریان بازگشتی، کانول تزریق به مدت دو دقیقه در محل باقی ماند. تزریق آنژیوتانسین دو به هسته پاراونتریکولار ۱۰ دقیقه پیش از القای آسیب ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه انجام شد. در گروه IR، سالین به این هسته تزریق گردید.

پس از پرفیوژن مجدد، نمونه خون با دور ۴۰۰۰ gZ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفیوژ و پلاسما به منظور آنالیز شیمیایی جمع‌آوری گردید.

مغز حیوان به سرعت از جمجمه خارج، در نیتروژن مایع فریز و در ۷۰°C -نگهداری شد. با استفاده از میکروتوم، مقاطع کروئال از مغز تهیه و ناحیه پاراونتریکولار با یک سوزن شماره ۱۵ برداشته شد. این بافت، همونیزه و سپس به منظور آنالیز بیش‌تر، سانتریفوژ گردید. در طول بیهوشی دمای بدن حیوانات با استفاده از چراغ و پد گرم‌کننده در دمای ۳۷°C نگه داشته شد. برای تأیید جای‌گزارای صحیح کانول در هسته پاراونتریکولار در پایان برخی از آزمایشات، موش‌ها به‌طور تصادفی کشته شده و مغز آن‌ها در فرمالین ۱۰٪ به مدت دو روز فیکس شد. برش‌های سریال در مقطع کروئال (۴۵ میکرومتر) از هیپوتالاموس تهیه و رنگ‌آمیزی به‌منظور بررسی محل تزریق از طریق شناسایی نوک مسیر سوزن تزریق در زیر میکروسکوپ نوری انجام شد. ثبت فعالیت عصب سمپاتیک کلیه: در کلیه گروه‌ها، کلیه چپ از طریق یک برش خلف صفاقی آشکار و شاخه‌ای از عصب کلیه از بافت چربی و بافت همبند جدا شد. عصب در یک جفت از الکترودهای دو قطبی نازک نقره قرار گرفت. محل تماس عصب-الکتروده، از لحاظ الکتریکی از بافت اطراف آن عایق‌بندی شد. سیگنال الکتریکی (۲۰،۰۰۰ بار) با Bio Amplifier ML136

ارزیابی عملکرد کلیه: غلظت پلاسمایی کراتینین و نیتروژن اوره خون (BUN) توسط روش کالریمتری با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس تعیین شد.

بررسی وضعیت بافتی کلیوی به‌دنبال تجویز دوزهای مختلف آنژیوتانسین II به‌داخل هسته پاراونتریکولار: کلیه‌ها در فرمالین ۱۰٪ فیکس و پس از آب‌گیری در پارافین قالب‌گیری گردید. از این کلیه‌ها مقاطع بافتی (چهار میکرومتر) تهیه و با اتوزین و همتوکسیلین رنگ‌آمیزی 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 نشان‌دهنده آسیب بودند.

اندازه‌گیری مارکرهای استرس اکسیداتیو در هسته پاراونتریکولار سطوح مالون دی‌آلدئید (MDA) در نمونه‌های بافتی با توجه به روش Esterbauer و Cheeseman تعیین شد.<sup>۱۴</sup> مالون دی‌آلدئید با تیوباریتوریک اسید (TBA) واکنش نشان داده و سبب تولید رنگ‌دانه صورتی شده که حداکثر جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر بود.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز Super Oxide Dismutase (SOD) با روش Paoletti و Mocali تعیین شد.<sup>۱۵</sup> در این

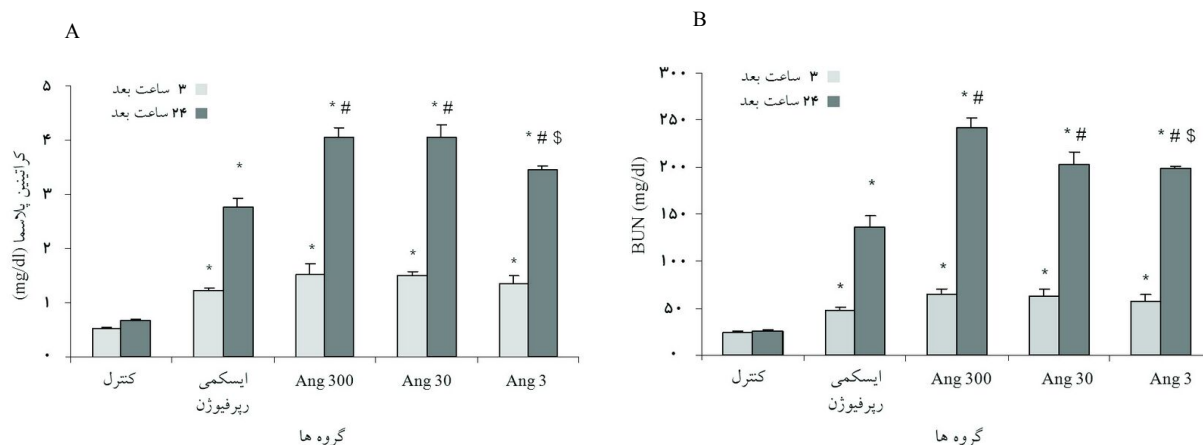
در گروه کنترل ۲۴ ساعت بعد از رپرفیوژن (نمودار A) و مقدار BUN  $10/1 \pm 136/42$  در گروه فقط ایسکمی- رپرفیوژن و به ترتیب  $13/64 \pm 242/16$  و  $14/1 \pm 202/5$  و  $4/2 \pm 197/5$  در گروه‌های دریافت‌کننده آنژیوتانسین II به میزان ۳۰۰ و ۳۰ و ۳ نانوگرم در مقایسه با  $4/4 \pm 25/3$  mg/dl در گروه کنترل ۲۴ ساعت بعد از رپرفیوژن (نمودار B،  $P < 0/05$ ). ارزیابی فشارخون سیستولیک به‌دنبال تزریق دوزهای مختلف آنژیوتانسین II به‌داخل هسته پاراونتریکولار: دوز آنژیوتانسین II به میزان ۳۰۰ نانوگرم به‌طور معنادار باعث افزایش فشارخون سیستولیک در طول آسیب حاد کلیوی شد (مقدار  $3/27 \pm 110/83$  میلی‌متر جیوه در گروه فقط ایسکمی- رپرفیوژن و به ترتیب  $2/5 \pm 127/00$  و  $2/23 \pm 118/1$  و  $1/82 \pm 115/31$  میلی‌متر جیوه در گروه‌های دریافت‌کننده آنژیوتانسین II به میزان ۳۰۰ و ۳۰ و ۳ نانوگرم در مقایسه با  $1/4 \pm 108/75$  میلی‌متر جیوه در گروه کنترل ۲۴ ساعت بعد از رپرفیوژن).

بررسی نقش سیستم سمپاتیک کلیوی در اثرات دوزهای مختلف آنژیوتانسین II در Paraventricular Nucleus (PVN) در آسیب ایسکمی رپرفیوژن کلیوی: برای تعیین این‌که آیا سیستم سمپاتیک محیطی در اثرات آنژیوتانسین II در PVN در ایجاد آسیب ایسکمی کلیوی اثر دارد فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که دوزهای مختلف آنژیوتانسین II باعث افزایش

آزمایش، آنیون سوپر اکسید از اکسیژن، در حضور Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)، مرکاپتواتانول و کلرید منگنز (II) تولید می‌شود. اکسیداسیون NADPH با در دسترس بودن آنیون‌های سوپراکسید در محیط، مرتبط بود. نتایج به صورت  $Mean \pm SEM$  بیان شد. به‌منظور انجام مقایسه بین گروه‌های آزمایشی، از آزمون آنالیز واریانس دو طرفه و سپس Tukey's test استفاده شد.  $P < 0/05$  از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

بررسی میزان آسیب کلیوی پس از تجویز دوزهای مختلف آنژیوتانسین II به داخل هسته پاراونتریکولار: تزریق یک طرفه آنژیوتانسین II (۳، ۳۰ و ۳۰۰ نانوگرم) به داخل هسته پاراونتریکولار باعث افزایش معنادار مقدار کراتینین پلاسما و BUN در ۳ و ۲۴ ساعت بعد از شروع رپرفیوژن در مقایسه با گروه کنترل و گروه ایسکمی- رپرفیوژن شد. به‌طوری‌که این افزایش در زمان سه ساعت مشهود و در ۲۴ ساعت به اوج خود رسید. (مقدار کراتینین  $0/18 \pm 4/05$  در گروه فقط ایسکمی رپرفیوژن و به ترتیب  $0/18 \pm 4/05$  و  $0/23 \pm 4/05$  و  $0/14 \pm 3/33$  در گروه‌های دریافت‌کننده آنژیوتانسین II به میزان ۳۰۰ و ۳۰ و ۳ نانوگرم در مقایسه با  $0/01 \pm 0/68$  mg/dl



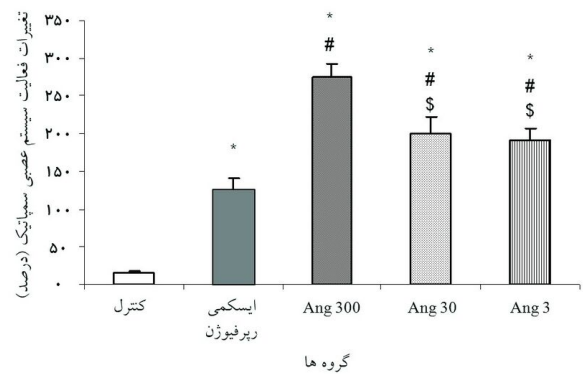
نمودار ۱: اثر تجویز دوزهای مختلف آنژیوتانسین II (Ang II) به داخل هسته پاراونتریکولار (PVN) سه و ۲۴ ساعت بعد از رپرفیوژن بر میزان کراتینین پلاسما (A) و BUN (B). داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است. \* اختلاف معناداری در سطح  $P < 0/05$  را با گروه کنترل نشان داد. # اختلاف معناداری در سطح  $P < 0/05$  را با گروه سه ساعت رپرفیوژن مربوطه را نشان داد. \$ اختلاف معناداری در سطح  $P < 0/05$  را با گروه آنژیوتانسین II ۳۰ یا ۳۰۰ نشان داد.

آنژیوتانسین II با دوزهای ۳۰۰، ۳۰ و ۳ نانوگرم در مقایسه با ۱۹۱۵/۲۵±۱۶/۴۵٪ و ۲۰۱±۲۰/۵۱، ۲۷۵/۷۵±۱۷/۵۸٪ در گروه ایسکمی-رپرفیوژن، نمودار ۲، (P<۰/۰۵).

اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو در هسته پاراونتریکولار بعد از تجویز دوزهای مختلف آنژیوتانسین II: فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز و غلظت MDA در هسته پاراونتریکولار به‌طور معناداری در گروه‌های دریافت‌کننده آنژیوتانسین II با دوزهای مختلف به ترتیب کاهش و افزایش یافت (نمودار ۳).

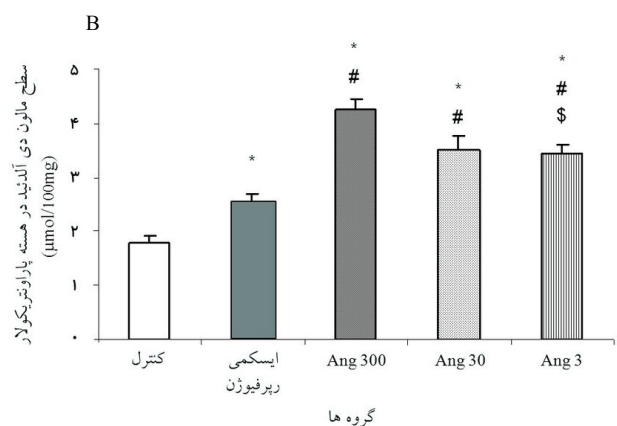
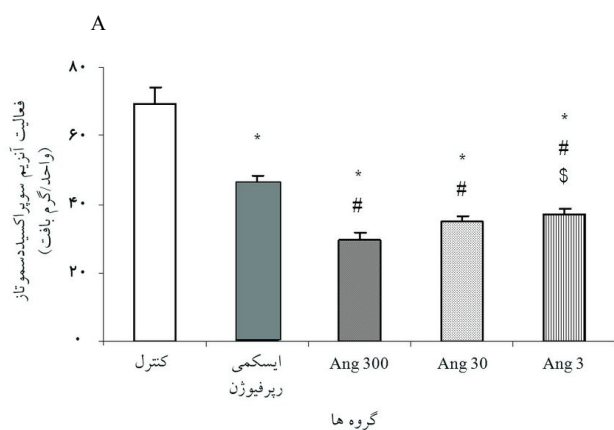
فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز  $46/2 \pm 1/85$  u/gr واحد در هر گرم بافت مغز در گروه ایسکمی-رپرفیوژن و  $29/5 \pm 2/06$  و  $35 \pm 1/68$  و  $37/25 \pm 1/43$  واحد در هر گرم بافت مغز در گروه‌های آنژیوتانسین ۳۰۰، ۳۰ و ۳ نانوگرم در مقایسه با  $69/5 \pm 4/3$  واحد در هر گرم بافت مغز در گروه کنترل، شکل A، (P<۰/۰۵) و غلظت MDA  $2/53 \pm 0/17$   $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  بافت مغز در گروه ایسکمی-رپرفیوژن و  $3/5 \pm 0/25$  و  $4/26 \pm 0/18$  و  $3/44 \pm 0/14$   $\mu\text{mol}/100\text{mg}$  بافت مغز در گروه‌های آنژیوتانسین ۳۰۰، ۳۰ و ۳ نانوگرم در مقایسه با  $1/79 \pm 0/12$  میکرومول در هر ۱۰۰ میلی‌گرم بافت مغز در گروه کنترل، شکل B، (P<۰/۰۵).

بررسی میزان آسیب بافت کلیوی پس از تجویز دوزهای مختلف

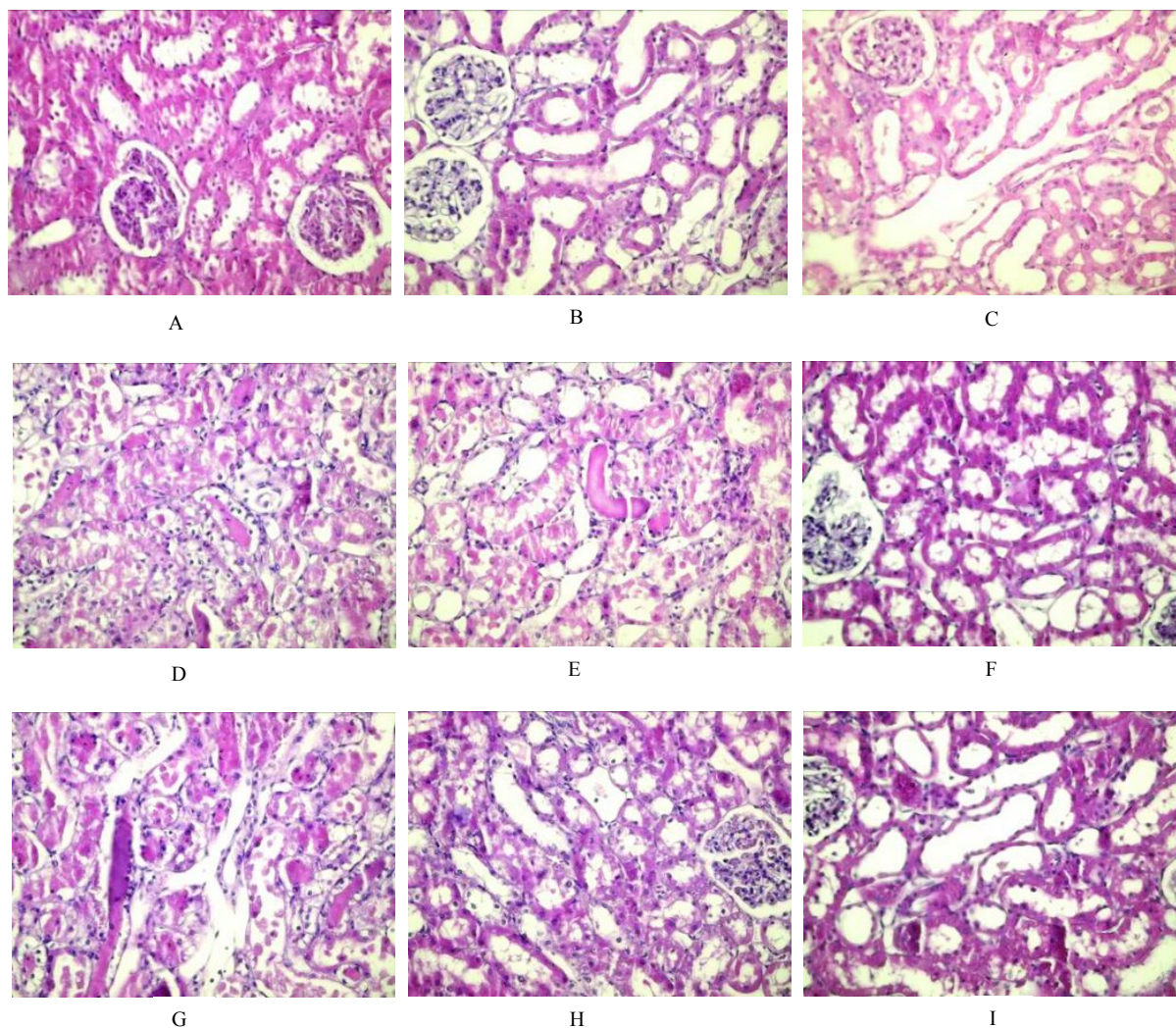


نمودار ۲: اثر تجویز دوزهای مختلف آنژیوتانسین II به داخل هسته پاراونتریکولار ۲۴ ساعت بعد از رپرفیوژن بر درصد فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شد. \* اختلاف معناداری در سطح P<۰/۰۵ را با گروه کنترل را نشان داد. # اختلاف معناداری در سطح P<۰/۰۵ را با گروه ایسکمی رپرفیوژن را نشان داد. \$ اختلاف معناداری در سطح P<۰/۰۵ را با گروه آنژیوتانسین ۳۰۰ نشان داد.

معنادار میزان درصد فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی در مقایسه با گروه ایسکمی-رپرفیوژن می‌شود. درصد فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک کلیوی در گروه آنژیوتانسین II با دوزهای مختلف در مقایسه با گروه ایسکمی رپرفیوژن افزایش معنادار نشان داد



نمودار ۳: اثر تجویز دوزهای مختلف آنژیوتانسین II به داخل هسته پاراونتریکولار ۲۴ ساعت بعد از رپرفیوژن بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز (A) و غلظت MDA (B) در هسته پاراونتریکولار. داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شد. \* اختلاف معناداری در سطح P<۰/۰۵ را با گروه کنترل را نشان داد. # اختلاف معناداری در سطح P<۰/۰۵ را با گروه ایسکمی رپرفیوژن را نشان داد. \$ اختلاف معناداری در سطح P<۰/۰۵ را با گروه آنژیوتانسین II ۳۰۰ نشان داد.



شکل ۱: بررسی میزان آسیب بافت کلیوی پس از تجویز دوزهای مختلف آنژیوتانسین II به داخل هسته‌های پاروانتریکلر. همه مقاطع کلیه حداقل در ۱۰ حوزه تصادفی که با هم تداخل نداشتند با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ بررسی شدند. A گروه کنترل، B گروه ایسکمی- رپرفیوژن سه ساعته، C گروه ایسکمی- رپرفیوژن ۲۴ ساعته، D گروه آنژیوتانسین دو ۳۰۰ mg سه ساعته، E گروه آنژیوتانسین دو ۳۰۰ mg، ۲۴ ساعته، F گروه آنژیوتانسین دو ۳۰ mg سه ساعته، G گروه آنژیوتانسین دو ۳۰ mg، ۲۴ ساعته، H گروه آنژیوتانسین دو ۳ mg سه ساعته، I گروه آنژیوتانسین دو ۳ mg، ۲۴ ساعته.

بافت گروه Ischemia-Reperfusion (IR) تغییرات قابل ملاحظه‌ای را نسبت به گروه شم نشان داد. این تغییرات شامل انهدام گسترده توبول‌ها، نکروز وسیع به‌خصوص در توبول‌های پروگزیمال، وجود انسداد توبولی قابل ملاحظه به‌ویژه در توبول‌های انتهایی‌تر، کم شدن ضخامت سلول‌ها و تحت فشار بودن سلول‌های اپیتلیال توبولی

آنژیوتانسین II به داخل هسته‌های پاروانتریکلر بر میزان آسیب بافت کلیوی: رنگ‌آمیزی مقاطع بافت کلیوی با هماتوکسیلین و اتوزین (H&E) صورت گرفت و با میکروسکوپ نوری مشاهده و بررسی گردید. در بافت کلیوی گروه کنترل، علی‌رغم نفرکتومی راست، ضایعه قابل ملاحظه‌ای در مقاطع بافتی کلیه چپ دیده نشد.

در مطالعه حاضر، ما بر روی مکانیسم تحریکی تنظیم عصب سمپاتیک کلیوی در هسته پاراونتریکولار متمرکز شدیم. به عنوان یک نوروترانسمیتر مهم تحریکی، آنژیوتانسین II فعالیت عصب سمپاتیک در چندین ناحیه از مغز از جمله هیپوتالاموس را تنظیم می کند. با استفاده از ثبت از کل سلول در برش های هیپوتالاموسی در موش های صحرایی، مشاهده شد که آنژیوتانسین II سبب القاء دیلاریزاسیون در نورون های نوع دو در هسته پاراونتریکولار می شود.<sup>۱۹</sup> در مطالعه Zheng نشان داده شد که در موش های صحرایی بیهوش مبتلا به نارسایی قلبی، افزایش تحرک در فعالیت عصب سمپاتیک کلیه با واسطه آنژیوتانسین وجود دارد.<sup>۱۸</sup> Llewellyn نشان داد که تحرک سمپاتیک با واسطه مکانیسم گلوتاماترژیک در هسته پاراونتریکولار، بخشی توسط فعالیت هسته پری اپتیک میانی یا اندام زیرفرورنیکسی میانجی گری می شود.<sup>۲۰</sup> در مجموع، این شواهد نتایج حاصل از این مطالعه که آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار سبب افزایش فعالیت عصب سمپاتیک کلیه می شود، را حمایت می کند.

یکی از یافته های امیدوارکننده که در طول دهه گذشته پدیدار شد این است که تولید گونه های واکنشی اکسیژن Reactive Oxygen Species (ROS) و فعال شدن آبخار سیگنالینگ وابسته به اکسیداسیون احیا زمینه اعمال آنژیوتانسین II را در مغز فراهم می کند. سودمندی آنتی اکسیدان ها در پرفشاری و نارسایی قلبی ناشی از آنژیوتانسین II، از طریق حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو در مناطقی از مغز که در تنظیم قلبی عروقی نقش دارد، نشان داده شده است.<sup>۱۱</sup>

شواهد نشان می دهد که ROS مرکزی در تنظیم فعالیت های قلبی عروقی و عملکرد شبکه های 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 می کند.<sup>۱۲</sup> Gao نشان داد که در خرگوش طبیعی، NAD(P)H اکسیداز مشتق از ROS، هنگام درمان تحت مزمن آنژیوتانسین II آگوزون به صورت مرکزی از طریق گیرنده های AT1، نقش مهمی در تعدیل فعالیت سمپاتیک و عملکرد بارورسپتورهای شریانی دارد.<sup>۱۳</sup> افزایش آنژیوتانسین II مرکزی، در تنظیم افزایشی گیرنده های AT1 در Rostral Ventrolateral Medulla (RVLM) و هسته پاراونتریکولار در پرفشاری ناشی از عروق کلیه مرتبط با افزایش استرس اکسیداتیو در این مناطق نقش دارد.<sup>۲۱</sup> این

می باشد. مقاطع بافتی در گروه های دریافت کننده دوزهای مختلف آنژیوتانسین II تغییرات زیادی را در مقایسه با گروه IR نشان دادند (شکل ۱). به طوری که میزان آسیب توبولی در گروه های رپرفیوژن ۲۴ ساعته در مقایسه با گروه های رپرفیوژن سه ساعته مربوطه به طور قابل ملاحظه ای بیش تر بود. در گروه های دریافت کننده آنژیوتانسین نیز گروه آنژیوتانسین ۳۰۰ به طور قابل ملاحظه ای دچار آسیب بیش تری در مقایسه با دو گروه دیگر آن شده بود.

## بحث

مطالعه حاضر نشان داد که تزریق یک طرفه دوزهای فارماکولوژیک آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار، سبب افزایش فعالیت عصب سمپاتیک و آسیب ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن مجدد کلیه می شود.

علی رغم گرایش به تغییر در پاسخ فشارخون به آنژیوتانسین II، تغییر در فشارخون شریانی و ضربان قلب در مطالعه حاضر در دوزهای ۳۰ و ۳ نانوگرم آنژیوتانسین II از نظر آماری معنادار نبود. البته آنژیوتانسین با دوز بالا یعنی ۳۰۰ نانوگرم توانست منجر به بالا بردن فشارخون گردد. تجویز آنژیوتانسین II به داخل هسته پاراونتریکولار در مطالعه Sriramula باعث القای فشارخون شد.<sup>۱۶</sup> البته بسته به دوز تزریق و دوره زمانی تزریق اثرات می تواند متفاوت باشد.

این محققین دوز ۲۰۰ ng/kg/min را برای ۱۴ روز استفاده کرده بودند. فعال سازی هسته پاراونتریکولار سبب تغییر قابل ملاحظه در خروجی های متفاوت سمپاتیک می شود<sup>۱۷</sup> که ممکن است این موضوع دلیلی برای عدم تغییر در فشارخون محسوب شود. Zheng به بررسی این که آیا فرکانس های افزایش یابنده (Renal Sympathetic Nerve Activity, RSNA) توسط افزایش در ضربان قلب، افزایش و با کاهش در ضربان قلب، کاهش می یابد، پرداخت. پس از استفاده از مسدودکننده گیرنده به منظور جلوگیری از تغییرات ضربان قلب، اثرات آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار بر روی RSNA را مشاهده نمود.<sup>۱۸</sup> بنابراین، ما تصور می کنیم که اثرات آنژیوتانسین II در هسته پاراونتریکولار مربوط به اثر مستقیم روی RSNA است نه به دلیل اثرات تغییر در فشارخون شریانی یا ضربان قلب.

همراه است. پژوهش حاضر نشان می‌دهد که هسته پاراونتریکولار یک سایت پاسخگوی مغزی است که به هنگام آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیوی، فعالیت عصب سمپاتیک کلیه را تنظیم می‌کند. استرس اکسیداتیو در هسته پاراونتریکولار، یکی از مکانیسم‌های حفظ تحریک سمپاتیک در آسیب ناشی از آنژیوتانسین II به هنگام وقوع ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه می‌باشد. 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 قسمتی از طرح به شماره ۱۴۸۷۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

مشاهدات و نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آنژیوتانسین II بر نورون‌های 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.<sup>۲۲</sup> Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) اکسیداز تولید شده توسط ROS، به میزان زیادی در توسعه پرفشاری ناشی از آنژیوتانسین II حداقل بخشی از طریق هسته پاراونتریکولار هیپوتالاموس دخیل است.<sup>۲۳</sup> در مجموع، نتایج نشان می‌دهد که آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه و فعالیت بیش از حد عصب سمپاتیک کلیوی با افزایش استرس اکسیداتیو مرکزی

## References

- Moss NG. Renal function and renal afferent and efferent nerve activity. *Am J Physiol* 1982;243(5):F425-33.
- Kalaitzidis RG, Karasavvidou D, Siamopoulos KC. Renal sympathetic denervation and renal physiology. *Curr Clin Pharmacol* 2013;8(3):189-96.
- DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997;77(1):75-197.
- Wang Y, Seto SW, Gollodge J. Therapeutic effects of renal denervation on renal failure. *Curr Neurovasc Res* 2013;10(2):172-84.
- 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* 2002;174(3):291-7.
- Kenney MJ, Weiss ML, Haywood JR. The paraventricular nucleus: an important component of the central neurocircuitry regulating sympathetic nerve outflow. *Acta Physiol Scand* 2003;177(1):7-15.
- Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem* 1989;264(28):16518-23.
- McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(6):901-18.
- Kang YM, Wang Y, Yang LM, Elks C, Cardinale J, Yu XJ, et al. TNF- $\alpha$  in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to sympathoexcitation in heart failure by modulating AT1 receptor and neurotransmitters. *Tohoku J Exp Med* 2010;222(4):251-63.
- Chan SH, Chan JY. Angiotensin-generated reactive oxygen species in brain and pathogenesis of cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal* 2013;19(10):1074-84.
- Kannan H, Hayashida Y, Yamashita H. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol* 1989;256(6 Pt 2):R1325-30.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, et al. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 2002;91(11):1038-45.
- Gao LI, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, et al. Sympathoexcitation by central ANG II: roles for AT1 receptor upregulation and NAD(P)H oxidase in RVLM. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(5):H2271-9.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.
- Paoletti F, Mocali A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods Enzymol* 1990;186:209-20.
- Sriramula S, Cardinale JP, Lazartigues E, Francis J. ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovasc Res* 2011;92(3):401-8.
- Kenney MJ, Weiss ML, Mendes T, Wang Y, Fels RJ. Role of paraventricular nucleus in regulation of sympathetic nerve frequency components. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(5):H1710-20.
- 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* 2009;297(5):R1364-74.
- 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* 2005;93(1):403-13.
- 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* 2012;302(4):R424-32.
- Oliveira-Sales EB1, Nishi EE, Carillo BA, Boim MA, Dolnikoff MS, Bergamaschi CT, et al. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. *Am J Hypertens* 2009;22(5):484-92.

22. Yu XJ, Suo YP, Qi J, Yang Q, Li HH, Zhang DM, et al. Interaction between AT1 receptor and NF- $\kappa$ B in hypothalamic paraventricular nucleus contributes to oxidative stress and sympathoexcitation by modulating neurotransmitters in heart failure. *Cardiovasc Toxicol* 2013;13(4):381-90.
23. Wang G1, Coleman CG, Chan J, Faraco G, Marques-Lopes J, Milner TA, et al. Angiotensin II slow-pressor hypertension enhances NMDA currents and NOX2-dependent superoxide production in hypothalamic paraventricular neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013;304(12):R1096-106.

## Angiotensin II of paraventricular nucleus exaggerates the renal ischemia-reperfusion injury

Behjat Seifi Ph.D.<sup>1\*</sup>  
Mehri Kadkhodae Ph.D.<sup>1</sup>  
Enayatollah Bakhshi Ph.D.<sup>2</sup>  
Mina Ranjbaran Ph.D. Student<sup>1</sup>  
Parisa Ahghari Ph.D. Student<sup>3</sup>  
Bahareh Yasrebi B.Sc.<sup>4</sup>

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

2- Department of Biostatistics, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran

3- Department of Physiology, Faculty of Medicine, International Campus, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Children Medical Center, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\* Corresponding author: Department of Medical Physiology, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.  
Tel: +98- 21- 64053288  
E-mail: b-seifi@tums.ac.ir

### Abstract

Received: 26 Nov. 2013 Accepted: 12 Feb. 2014 Available online: 01 Apr. 2014

**Background:** The renal sympathetic nerve activity (RSNA) is enhanced in renal failure. Paraventricular nucleus in hypothalamus is an important central site to regulate sympathetic activity. There are angiotensin II (Ang) II receptors in this nucleus. The aim of this study was to evaluate the effects of angiotensin II in hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on renal ischemia-reperfusion injury and RSNA.

**Methods:** This study was done at 2013 in Physiology department of Tehran University of Medical Sciences. One week before the induction of renal Ischemia-Reperfusion (IR) in Sprague-Dawley rats, a cannula was inserted into the right PVN for microinjection of different doses of Ang II (3, 30, and 300 ng). Then right nephrectomy was done. After one week recovery, renal IR injury was induced by clamping the left renal artery for 45 minute and then reperfusion for 3 or 24 hour. Ten minutes before the induction of renal ischemia-reperfusion, administration of different doses of angiotensin II were done in different groups. In all animals, left renal sympathetic activity was recorded before and during renal ischemia. After 3 or 24 hours reperfusion the blood, kidney and brain were collected to assay renal function and histology and oxidative stress indices Superoxide Dismutase, SOD and Malondialdehyde, MDA) in PVN.

**Results:** Administration of different pharmacological doses of angiotensin II into PVN exaggerated the renal IR injury. Angiotensin II in different doses increased the plasma creatinine and BUN levels and renal histological markers in comparison to renal IR injury ( $P < 0.05$ ). Angiotensin II had detrimental effects on RSNA and oxidative stress indices Super Oxide Dismutase (SOD) and Malondialdehyde (MDA) in PVN as the dose was increased ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** These data showed that the PVN is a responsive site for central Ang II-induced damage in renal IR injury. We suggested the central effects of Ang II in the PVN on renal IR injury are mediated by oxidative stress in the PVN, and the peripheral effects by a sympathetic pathway.

**Keywords:** angiotensin II, ischemia, kidney, paraventricular hypothalamic nucleus, reperfusion injury, sympathetic nervous system.