

## اثر تجویز طولانی‌مدت نیترات سدیم بر عملکرد کلیه در موش‌های صحرایی ماده

دکتر سجاد جدی<sup>id</sup>، دکتر نصیبه یوسف‌زاده<sup>id</sup>، دکتر اصغر قاسمی<sup>id</sup>

مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، ولنجک، خیابان یمن، خیابان پروانه، پلاک ۲۴، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد درون‌ریز، دکتر اصغر قاسمی؛ e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** با وجود شیوع بالاتر بیماری‌های کلیوی در جنس ماده، اثرات نیترات بر عملکرد کلیه عمدتاً در جنس نر مطالعه شده است. هدف مطالعه حاضر تعیین اثرات تجویز طولانی‌مدت نیترات سدیم بر شاخص‌های عملکرد کلیه شامل میزان فیلتراسیون گلومرولی تخمینی (eGFR) و سطح سرمی اوره و کراتینین در موش صحرایی ماده بالغ سالم می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** موش‌های صحرایی ماده ویستار به ۲ گروه (۱۰ سر در هر گروه) تقسیم شدند: گروه شاهد که آب آشامیدنی و گروه نیترات که آب آشامیدنی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات سدیم به مدت ۹ ماه دریافت کردند. وزن بدن، سطح سرمی اوره و کراتینین در ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری و eGFR محاسبه شد. هم‌چنین سطح متابولیت‌های اکسید نیتریک (NOx) در سرم و بافت کلیه موش‌های صحرایی ماده در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: در انتهای مطالعه، وزن موش‌های صحرایی و هم‌چنین سطح سرمی اوره و کراتینین در گروه شاهد به طور معنی‌دار بالاتر و سطح eGFR به طور معنی‌دار پایین‌تر از ابتدای مطالعه بود. نه ماه دریافت نیترات سدیم از طریق آب آشامیدنی، مانع از افزایش وزن و هم‌چنین افزایش سطح سرمی اوره و کراتینین و کاهش سطح eGFR گردید. هم‌چنین گروه تیمار شده با نیترات سدیم دارای سطح بالاتر سرمی و کلیوی NOx در انتهای مطالعه بودند. نتیجه‌گیری: تجویز نیترات منجر به بهبود عملکرد کلیه در موش‌های صحرایی ماده بالغ سالم گردید. این اثرات مفید می‌تواند ناشی از افزایش سطح سرمی و بافتی NOx باشد.

**واژگان کلیدی:** عملکرد کلیه، نیترات، اکسید نیتریک، میزان فیلتراسیون گلومرولی تخمینی

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۶/۱۳ - دریافت اصلاحیه: ۱۴۰۰/۸/۲ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۹

### مقدمه

به رتبه ۱۰ رسیده است.<sup>۲,۳</sup> داروهای مختلفی برای بهبود CKD و کاهش عوارض ناشی از آن وجود دارد که برخی از آن‌ها دارای عوارض جانبی نامطلوب می‌باشند و بنابراین انجام تحقیقات بیشتر برای ارائه درمان‌های مؤثرتر ضرورت دارد.<sup>۴</sup>

اکسید نیتریک<sup>iii</sup> (NO) یک مولکول بیولوژیک ساده با نقش‌های متعدد در کلیه است.<sup>۵</sup> کاهش فراهم زیستی<sup>iv</sup> NO به علت آسیب یا اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال کلیه و هم‌چنین کاهش تولید آن، یک عامل خطر برای CKD می-

بیماری مزمن کلیه<sup>i</sup> (CKD) یک مشکل جهانی با هزینه اقتصادی بالا برای سیستم بهداشتی است و با افزایش خطر بیماری‌های قلبی عروقی، مرگ و کاهش کیفیت زندگی همراه است.<sup>۱</sup> بیماری مزمن کلیه بیش از ۱۰ درصد جمعیت جهان را درگیر کرده و بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی<sup>ii</sup>، در سال ۱۹۹۰ رتبه ۲۷ را در بین علل مرگ و میر در سراسر جهان دارا بوده که در سال ۲۰۱۰ به رتبه ۱۸ در سال ۲۰۱۹

iii- Nitric oxide  
iv- Bioavailability

i - Chronic kidney disease  
ii - Global Burden of Disease

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی رسید (کد اخلاق: IR.SBMU.ENDOCRINE.REC.1398.111).

### مراحل اجرای مطالعه

در این مطالعه، موش‌های صحرایی ماده (نژاد ویستار با سن ۸ ماه) به ۲ گروه تقسیم شدند (۱۰ سر در هر گروه): گروه شاهد (گروه ۱) که آب آشامیدنی معمولی دریافت کردند و گروه نیترا (گروه ۲) که به مدت ۹ ماه آب آشامیدنی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نیترا سدیم در لیتر دریافت می‌کردند. وزن بدن (گرم)، سطح سرمی اوره (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و کراتینین (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در ابتدای مطالعه و همچنین ۹ ماه بعد از تجویز نیترا سدیم در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد و میزان فیلتراسیون گلومرولی تخمینی (eGFR) به عنوان شاخص عملکرد کلیه محاسبه گردید. همچنین سطح سرمی و بافتی متابولیت‌های اکسید نیتریک (NO<sub>x</sub>) در گروه‌های مورد مطالعه در انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری سطح سرمی اوره و کراتینین

پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، حیوانات با استفاده از پنتوباریتال سدیم (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش شدند و نمونه‌های خون از دم موش‌های صحرایی در همه گروه‌ها جمع‌آوری شد. نمونه خون به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سرم برای اندازه‌گیری اوره و کراتینین جدا شد. سرم‌ها تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. اوره و کراتینین سرم در ابتدا و انتهای مطالعه، با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر Selectra E و کیت‌های شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری شد.

### محاسبه شاخص eGFR

پس از اندازه‌گیری وزن بدن و غلظت‌های کراتینین و اوره سرم، مقدار eGFR با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.<sup>۱۹</sup>

اگر کراتینین سرم کمتر از ۰.۵ میکرومول در لیتر باشد:

باشد.<sup>۱۶</sup> بنابراین، مداخلاتی که بتوانند فراهم زیستی NO را افزایش دهند، می‌توانند به عنوان یک رویکرد درمانی مناسب برای CKD ارائه شوند. در مطالعات انسانی و حیوانی مختلف گزارش شده است که تجویز نیترا و نیتريت معدنی سطوح کاهش یافته NO در شرایطی مثل چاقی و دیابت را هم در سرم و هم در بافت کلیه جبران می‌کند.<sup>۷-۹</sup> همچنین مطالعات نشان دادند که تجویز نیتريت و نیتترات اثرات حفاظتی در عملکرد کلیه در موش‌های صحرایی نر مبتلا به سندروم متابولیک،<sup>۱۰</sup> دیابت نوع ۱<sup>۱۱</sup> و دیابت نوع ۲<sup>۱۲</sup> دارند که با کاهش سطح سرمی اوره و کراتینین و افزایش میزان فیلتراسیون گلومرولی (GFR<sup>i</sup>) نشان داده می‌شوند.

در یک مطالعه‌ی متآنالیز نشان داده شده است که شیوع CKD در دو سوم مطالعاتی که به طور هم‌زمان هر دو جنس را بررسی کردند، در زنان شایع‌تر از مردان می‌باشد.<sup>۱</sup> با وجود شیوع بیشتر بیماری کلیوی در جنس ماده، اثرات مفید نیترا و نیتريت بیشتر در جنس نر مورد مطالعه قرار گرفته است. همچنین در مطالعات حیوانی<sup>۱۳</sup> و انسانی<sup>۱۴</sup> گزارش شده است که با افزایش سن، GFR که به عنوان شاخص عملکرد کلیه مطرح است، کاهش می‌یابد. این کاهش GFR ناشی از افزایش سن در افراد بدون بیماری کلیوی نیز گزارش شده است.<sup>۱۵،۱۶</sup> با توجه به محدود بودن مطالعات در مورد اثرات نیترا و نیتريت در جنس ماده و این که برخی از جنبه‌های تجویز نیترا و نیتريت مثل مدت زمان تجویز و اثر آن بر تغییرات ناشی از افزایش سن به خوبی مشخص نشده است،<sup>۱۷</sup> هدف این مطالعه بررسی اثر تجویز نیترا سدیم به مدت ۹ ماه بر شاخص‌های عملکرد کلیه در موش صحرایی ماده بود.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

موش‌های صحرایی ماده از نژاد ویستار<sup>ii</sup> در حیوان‌خانه-ی پژوهشکده‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در دمای ۲۲±۱ درجه‌ی سلسیوس و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. استانداردهای لازم اخلاقی در مورد روش کار حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید<sup>۱۸</sup> و مطالعه به تایید کمیته سازمانی اخلاق در پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم

i - Glomerular filtration rate

ii - Wistar

$eGFR = \frac{1.73}{1.73} \times \frac{1.73}{1.73} \times \text{غلظت کراتینین (میکرومول در لیتر)} \times \text{وزن بدن (گرم)} \times 880 = \text{میکرولیتر در دقیقه}$

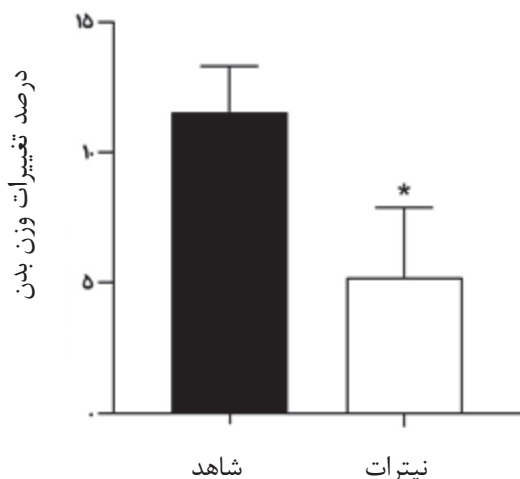
اگر کراتینین سرم بالاتر از ۵۲ میکرو مول بر لیتر باشد:

$eGFR = \frac{1.73}{1.73} \times \text{غلظت کراتینین (میکرومول در لیتر)} \times \text{وزن بدن (گرم)} \times 880 = \text{میکرولیتر در دقیقه}$

## یافته‌ها

### اثر تجویز نیترات سدیم بر وزن بدن در موش‌های صحرایی ماده

نتایج مطالعه نشان داد که وزن موش‌های صحرایی در انتهای مطالعه در گروه شاهد ۱۱ درصد ( $244/0 \pm 4/5$  گرم در انتهای مطالعه) و نیترات ۵ درصد ( $235/4 \pm 3/9$  گرم در انتهای مطالعه) بالاتر از ابتدای مطالعه بود که این درصد تغییرات در گروه نیترات به طور معنی‌دار کمتر از گروه شاهد بود (نمودار ۱).



نمودار ۱- درصد تغییرات وزن بدن در موش‌های صحرایی ماده به دنبال ۹ ماه تجویز نیترات سدیم در مقایسه با گروه شاهد. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر می‌باشد. \*تفاوت با گروه شاهد،  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار است.

### اثر تجویز نیترات سدیم بر سطح سرمی و بافتی متابولیت‌های اکسید نیتریک در موش‌های صحرایی ماده

مصرف نیترات سدیم به مدت ۹ ماه در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به افزایش معنی‌دار سطح  $NO_x$  در سرم (۲۱ درصد) و بافت کلیه (۲۶ درصد) در موش‌های صحرایی ماده در انتهای مطالعه گردید (نمودار ۲).

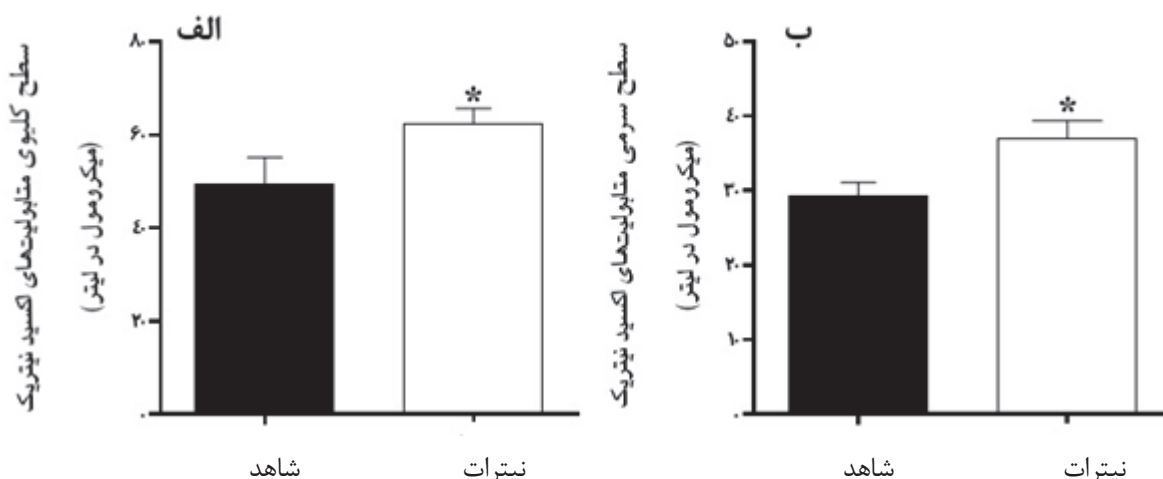
### اندازه‌گیری سطح سرمی و بافتی متابولیت‌های اکسید نیتریک

در انتهای مطالعه، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، نمونه‌های سرمی و بافت کلیه از موش‌های صحرایی جمع‌آوری شد. برای اندازه‌گیری  $NO_x$  سرمی و بافتی از روش رنگ‌سنجی گریس<sup>i</sup> استفاده گردید. به طور خلاصه، ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر سولفات روی<sup>ii</sup> جهت پروتئین‌زدایی به نمونه‌های کلیوی هوموژن شده و یا نمونه‌های سرمی اضافه شد و پس از مخلوط کردن؛ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. سپس به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بالایی، ۱۰۰ میکرولیتر وانادیوم کلرید<sup>iii</sup> (۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد تا نیترات را به نیتريت احیاء کند. سپس ۵۰ میکرولیتر سولفانیل آمید<sup>iv</sup> (۲٪) و ۵۰ میکرولیتر اتیلین دی آمید<sup>v</sup> (۱٪) به محلول اضافه گردید و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سلسیوس انکوبه شد. جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی استاندارد (۰ تا ۱۰۰ میکرومولار نیترات سدیم)، غلظت نمونه‌ها محاسبه شد.

### آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶ انجام شد. یافته‌های کمی به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد میانگین بیان شده‌اند. جهت مقایسه‌ی درصد تغییرات سطح سرمی اوره و کراتینین، وزن بدن، سطح  $NO_x$  سرمی و کلیوی و  $eGFR$  بین دو گروه؛ از آزمون تی-مستقل استفاده شد.  $P$  کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

i - Griess  
ii - Zinc sulfate  
iii - Vanadium (III) chloride  
iv - Sulfanilamide  
v - N-1-(naphthyl) ethylenediamine

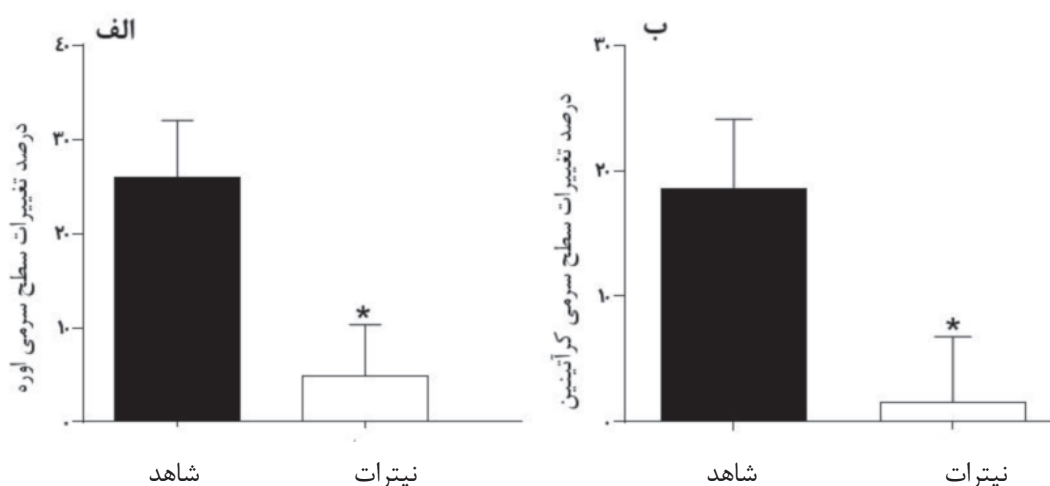


نمودار ۲- اثر تجویز نیترات سدیم بر غلظت متابولیت‌های اکسید نیتریک در بافت کلیه (الف) و سرم (ب) در موش‌های صحرایی ماده. تعداد موش صحرایی در هر گروه ۱۰ سر می‌باشد. \* تفاوت با گروه شاهد،  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار است.

در گروه نیترات در انتهای مطالعه سطوح سرمی اوره و کراتینین تفاوت معنی‌دار با ابتدای مطالعه نشان ندادند (سطح سرمی اوره:  $25/90 \pm 1/59$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در انتهای مطالعه در مقابل  $25/0 \pm 1/48$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در ابتدای مطالعه، سطح سرمی کراتینین:  $0/57 \pm 0/03$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در انتهای مطالعه در مقابل  $0/56 \pm 0/02$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در ابتدای مطالعه). تجویز نیترات منجر به کاهش معنی‌دار در درصد تغییرات سطوح سرمی اوره ( $P = 0/018$ ) و کراتینین ( $P = 0/028$ ) در گروه نیترات نسبت به گروه شاهد گردید (نمودار ۳).

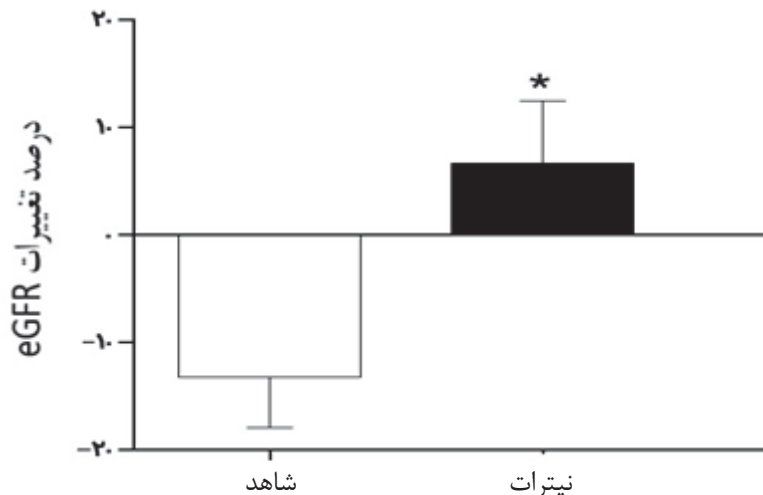
اثر تجویز نیترات سدیم بر سطوح سرمی اوره و کراتینین در موش‌های صحرایی ماده

در انتهای مطالعه سطوح سرمی اوره و کراتینین موش‌های صحرایی در گروه شاهد به ترتیب ۲۵/۶ درصد ( $P = 0/001$ ) و ۱۷/۰ درصد ( $P = 0/046$ ) بالاتر از ابتدای مطالعه بود (سطح سرمی اوره:  $30/4 \pm 1/46$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در انتهای مطالعه در مقابل  $24/2 \pm 0/68$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در ابتدای مطالعه، سطح سرمی کراتینین:  $0/62 \pm 0/03$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در انتهای مطالعه در مقابل  $0/53 \pm 0/03$  میلی‌گرم در دسی‌لیتر در ابتدای مطالعه).



نمودار ۳- اثر تجویز نیترات سدیم بر درصد تغییرات سطح سرمی اوره (الف) و کراتینین (ب) در موش‌های صحرایی ماده. تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه ۱۰ سر می‌باشد. \* تفاوت با گروه شاهد،  $P < 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار است.

ولی در گروه نیترات تاثیر معنی‌دار مشاهده نشد ( $1252 \pm 56$  میکرولیتر در دقیقه در انتهای مطالعه در مقابل  $1197 \pm 73$  میکرولیتر در دقیقه در ابتدای مطالعه ( $P=0/053$ )). تجویز نیترات منجر به افزایش معنی‌دار ( $P=0/015$ ) در درصد تغییرات eGFR در گروه نیترات نسبت به گروه شاهد گردید (نمودار ۴).



نمودار ۴- اثر تجویز نیترات سدیم بر درصد تغییرات eGFR در موش‌های صحرائی ماده. تعداد موش‌های صحرائی در هر گروه ۱۰ سر می‌باشد. \* تفاوت با گروه شاهد،  $P < 0/05$  از نظر آماری معنی‌دار است.

## بحث

تجویز آن باشد. این نتیجه‌گیری در مطالعه متآنالیز اخیر در موش‌های صحرائی نر نیز به اثبات رسیده است؛ به این صورت که تجویز نیترات دارای اثرات ضد چاقی بوده و این اثرات وابسته به سن موش‌های صحرائی، مدت زمان مطالعه و همچنین دوز نیترات مصرفی می‌باشد.<sup>۲۴</sup> نیترات و نیتريت اثرات ضد چاقی خود را با کاهش وزن بدن و بهبود هومئوستاز گلوکز و انسولین اعمال می‌کنند؛<sup>۲۵</sup> همچنین کاهش مقدار چربی احشایی<sup>۲۶</sup> و نیز افزایش تبدیل بافت چربی سفید به قهوه‌ای در مطالعات گذشته در حیوانات نر به دنبال تجویز نیترات و نیتريت گزارش شده است.<sup>۲۷،۲۸</sup>

با افزایش سن موش‌های صحرائی گروه شاهد در مطالعه‌ی حاضر، سطوح سرمی اوره و کراتینین افزایش یافت، که با کاهش eGFR همراه شد. موافق با نتایج حاضر، سطوح سرمی افزایش یافته‌ی کراتینین در موش‌های صحرائی ماده در سن ۱۲ ماهگی در مقایسه با سن ۱، ۳، ۶ و ۹ ماهگی، گزارش شده است.<sup>۱۲</sup> افزایش مشابه در سطح سرمی اوره در موش‌های صحرائی ماده ۹ ماهه نسبت به ۱، ۳، ۶ و ۹ ماهه نیز مشاهده شده است.<sup>۱۳</sup> همچنین غلظت سرمی اوره و کراتینین در موش‌های صحرائی ماده با سن ۱۰۸ هفته در مقایسه با سن کمتر (۱۷ هفته) به طور قابل توجهی

اثر تجویز نیترات سدیم بر eGFR در موش‌های صحرائی ماده

در انتهای مطالعه سطح eGFR موش‌های صحرائی در گروه شاهد ۱۴/۶ درصد کمتر از ابتدای مطالعه بود ( $1072 \pm 45$  میکرولیتر در دقیقه در انتهای مطالعه در مقابل  $1256 \pm 62$  میکرولیتر در دقیقه در ابتدای مطالعه ( $P=0/028$ )).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تجویز طولانی مدت نیترات سدیم منجر به بهبود عملکرد کلیه در موش‌های صحرائی ماده می‌گردد که با افزایش eGFR و کاهش سطح سرمی اوره و کراتینین همراه می‌باشد. این اثرات مفید نیترات تا حدی می‌تواند ناشی از افزایش سطح سرمی و سطح کلیوی NOx باشد.

در مطالعه حاضر، تجویز نیترات سدیم به مدت ۹ ماه با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از افزایش وزن مشاهده شده در گروه شاهد جلوگیری کرد. موافق نتایج حاضر، کاهش وزن بدن به دنبال تجویز نیترات به مدت ۵ ماه (دوز ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)،<sup>۲۰</sup> ۶ ماه (دوز ۵۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)<sup>۲۱</sup> و ۲ سال (دوز ۴۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر)<sup>۲۲</sup> به صورت وابسته به دوز در موش‌های صحرائی ماده گزارش شده است. خلاف نتایج حاضر؛ در مطالعه‌ی تیل و همکاران، تجویز نیتريت سدیم با دوز ۸۱ و ۲۴۳۲ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۱۳ هفته تاثیری بر وزن بدن موش‌های صحرائی ماده نداشت.<sup>۲۳</sup> به نظر می‌رسد تفاوت‌های موجود بر وزن بدن در مطالعات مختلف وابسته به دوز نیترات مصرفی و همچنین مدت زمان

بیشتر بود.<sup>۲۹</sup> در مطالعات انسانی نیز گزارش شده است که با افزایش سن از ۳۰ تا ۴۰ سالگی کاهش عملکرد کلیه مشاهده می‌گردد؛ که از سن ۵۰ تا ۶۰ سالگی این کاهش سرعت بیشتری می‌گیرد.<sup>۱۴</sup> عواملی که عملکرد کلیه را با افزایش سن به خطر می‌اندازند شامل؛ کاهش پیشرونده جریان خون کلیوی و همچنین تغییرات ساختاری در کلیه می‌باشد.<sup>۲۰،۳۱</sup> GFR به تدریج با افزایش سن در افراد بدون بیماری کلیوی نیز کاهش می‌یابد که به طور کلی با کاهش تعداد نفرون‌ها و گلوامرول‌های فعال همراه است.<sup>۱۵،۱۶</sup> همچنین تغییر متابولیسم عضله (محل ذخیره کراتینین) و افزایش جذب مجدد اوره در مجرای جمع‌کننده و انتشار آن به فضای بین بافتی مدولا و خون نیز می‌تواند در این کاهش عملکرد کلیه با افزایش سن نقش داشته باشد.<sup>۱۳،۳۲</sup> مطالعات گذشته نشان داده‌اند که به علت احتمال عفونت مجاری ادراری بیشتر در جنس ماده، شیوع بیماری کلیوی در جنس ماده بیشتر از جنس نر است، همچنین این شیوع با افزایش سن در جنس ماده بیشتر افزایش می‌یابد (حدود ۴ درصد در دوران قبل از یائسگی که به حدود ۲۰ درصد بعد از یائسگی می‌رسد<sup>۳۳</sup>). دلیل این تفاوت مشاهده شده در دو جنس به طور کامل مشخص نشده است ولی برخی از مطالعات تفاوت در هورمون‌های جنسی به ویژه استروژن و همچنین عوامل خطر مربوط به بیماری کلیه (مثل شیوع بالاتر چاقی و فشار خون در زنان بعد از یائسگی) را به عنوان دلایل اصلی پیشنهاد می‌کنند.<sup>۳۴</sup> مشخص شده است که استروژن با مهار سیستم‌های رنین-آنژیوتانسین ۲ و همچنین تحریک سیستم NO و متالوپروتئازها در کلیه دارای نقش حفاظتی می‌باشد. به این صورت که استروژن سطوح بافتی و فعالیت آنژیوتانسین ۲ و آنزیم مبدل آنژیوتانسین و همچنین بیان گیرنده آنژیوتانسین ۱ را در کلیه کاهش می‌دهد.<sup>۳۵</sup> استروژن بیان NO سنتاز اندوتلیالی (eNOS) و متالوپروتئازها را افزایش (عناصر کلیدی در جلوگیری از پیشرفت CKD)، آسیمتریک دی متیل آرژنین (مهارکننده تولید NO) و استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد.<sup>۳۶-۳۸</sup>

تجویز نیترات سدیم عملکرد کلیه را با افزایش eGFR و کاهش سطح سرمی اوره و کراتینین در موش‌های صحرایی ماده بهبود می‌بخشد. اگرچه مطالعه‌ای وجود ندارد که اثرات تجویز ۹ ماه نیترات سدیم را بر عملکرد کلیه در موش‌های صحرایی ۱۷ ماهه ماده نشان دهد، مطابق با نتایج حاضر، گزارش شده است که تجویز نیتريت سدیم به مدت ۴ هفته

منجر به بهبود عملکرد کلیه در موش‌های صحرایی نر با دیابت نوع ۱ می‌گردد.<sup>۱۱</sup> اثر مفید تجویز نیترات سدیم (۱۰ هفته با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در هر روز) بر عملکرد کلیه در موش‌های صحرایی نر مبتلا به سندروم متابولیک نیز گزارش شده است که این اثر با کاهش سطح سرمی اوره و کراتینین نشان داده شده است.<sup>۱۰</sup> در مطالعه انجام شده در موش‌های صحرایی نر با دیابت نوع ۲ نیز بهبود عملکرد کلیه (افزایش در eGFR و کاهش سطح سرمی اوره و کراتینین) به دنبال تجویز نیتريت سدیم (۹ هفته با دوز ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) گزارش شده است.<sup>۱۲</sup> این اثرات مفید نیترات بر عملکرد کلیه می‌تواند ناشی از کاهش اسید اوریک خون و همچنین افزایش NO در دسترس باشد.<sup>۱۰</sup>

مطالعات نشان داده‌اند که مصرف نیتريت به عنوان دهنده NO از آسیب کلیوی ایجاد شده به علت استفاده از L-NAME (مهارکننده NOS) در موش صحرایی نر جلوگیری می‌کند.<sup>۳۹</sup> همچنین مصرف مهارکننده NOS منجر به پر فشاری خون و آسیب گلوامرولی در کلیه می‌شود.<sup>۴۰</sup> اثرات محافظتی NO بر عملکرد کلیه حداقل تا حدی به دلیل اثرات ضد اکسیداتیو و ضد التهابی NO است.<sup>۴۱</sup> تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها در موش‌های سوری که دچار اختلال در عملکرد کلیه بودند منجر به افزایش در دسترس بودن NO و به دنبال آن بهبود عملکرد کلیه (افزایش GFR) می‌گردد و این اثر حفاظتی در حضور مهارکننده NO از بین می‌رود.<sup>۴۲</sup> گشاد شدن عروق شریانیچه آوران کلیه عمدتاً منجر به افزایش GFR می‌شود که توسط NO صورت می‌گیرد.<sup>۴۳</sup>

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز نیترات سدیم منجر به افزایش سطح سرمی و بافتی NO<sub>x</sub> در موش‌های صحرایی ماده می‌گردد؛ که مشابه با مطالعات گذشته در جنس ماده<sup>۲۱</sup> و نر<sup>۸</sup> بود. بنابراین با توجه به بحث صورت گرفته، سازوکار احتمالی برای اثر نیترات بر بهبود عملکرد کلیه در مطالعه حاضر؛ می‌تواند ناشی از افزایش سطح سرمی و بافتی NO<sub>x</sub> در موش‌های صحرایی ماده باشد. به این صورت که نیترات بعد از ورود به سلول به نیتريت و سپس به NO احیاء می‌شود و NO تولید شده سبب افزایش cGMP<sup>i</sup> از طریق فعال کردن گوانیل سیکلاز محلول می‌شود.<sup>۲۸</sup> cGMP با افزایش GFR موجب بهبود عملکرد کلیه می‌گردد.<sup>۴۴</sup>

سیاسگزاری: نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مساعدت و همکاری مرکز تحقیقات فیزیولوژی غدد، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در انجام این پژوهش ابراز می‌دارند. مطالعه حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد پژوهان ۲۰۲۰۹ و کد طرح ۹۸۰۹۶ است.

## References

- Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0158765-e.
- Duan J, Wang C, Liu D, Qiao Y, Pan Sh, Jiang D, et al. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey. *Sci Rep* 2019; 9: 10408.
- Jager KJ, Fraser SDS. The ascending rank of chronic kidney disease in the global burden of disease study. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32(suppl\_2): ii121-ii18.
- Whittaker CF, Miklich MA, Patel RS, Fink JC. Medication Safety Principles and Practice in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13: 1738-46.
- Lee J. Nitric oxide in the kidney : its physiological role and pathophysiological implications. *Electrolyte Blood Press* 2008; 6: 27-34.
- Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294: F1-9.
- Jeddi S, Gheibi S, Carlström M, Kashfi K, Ghasemi A. Long-term co-administration of sodium nitrite and sodium hydrosulfide inhibits hepatic gluconeogenesis in male type 2 diabetic rats: Role of PI3K-Akt-eNOS pathway. *Life Sciences* 2021; 265: 118770.
- Varzandi T, Abdollahifar MA, Rohani SAH, Piryaee A, Zadeh-Vakili A, Jeddi S, et al. Effect of long-term nitrite administration on browning of white adipose tissue in type 2 diabetic rats: A stereological study. *Life Sci* 2018; 207: 219-26.
- Gilchrist M, Winyard PG, Fulford J, Anning C, Shore AC, Benjamin N. Dietary nitrate supplementation improves reaction time in type 2 diabetes: development and application of a novel nitrate-depleted beetroot juice placebo. *Nitric oxide* 2014; 40: 67-74.
- Essawy SS, Abdel-Sater KA, Elbaz AA. Comparing the effects of inorganic nitrate and allopurinol in renovascular complications of metabolic syndrome in rats: role of nitric oxide and uric acid. *Arch Med Sci* 2014; 10: 537-45.
- Ohtake K, Ishiyama Y, Uchida H, Muraki E, Kobayashi J. Dietary nitrite inhibits early glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Nitric oxide* 2007; 17: 75-81.
- Jeddi S, Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. Sodium hydrosulfide has no additive effects on nitrite-inhibited renal gluconeogenesis in type 2 diabetic rats. *Life Sci* 2021; 283: 119870.
- Olukiran OS, Akomolafe RO, Ilesanmi OS, Imafidon CE, Alabi QK. Age-related changes in urinary protein excretion in relation to indices of renal function in Wistar rats. *Animal Model Exp Med* 2018; 1: 295-304.
- Glasscock RJ, Winearls C. Ageing and the glomerular filtration rate: truths and consequences. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2009; 120: 419-28.
- Darmady EM, Offer J, Woodhouse MA. The parameters of the ageing kidney. *J Pathol* 1973; 109: 195-207.
- Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG. The aging kidney. *Kidney Int* 2008; 74: 710-20.
- Ghasemi A, Jeddi S. Anti-obesity and anti-diabetic effects of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2017; 70: 9-24.
- Ahmadi-Noorbakhsh S, Mirabzadeh Ardakani E, Sadighi J, Aldavood SJ, Farajli Abbasi M, Farzad-Mohajeri S. Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals in Iran. *Lab Amin(NY)* 2021; 50: 303-5.
- Besseling PJ, Pieters TT, Nguyen ITN, de Bree PM, Willekes N, Dijk AH, et al. A plasma creatinine- and urea-based equation to estimate glomerular filtration rate in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2021; 320: F518-f24.
- Chaoui AA, Zaki A, Talibi A, Chait A, Derouiche A, Aboussaouira T, et al. Effects of inorganic nitrates on thyroid gland activity and morphology in female rats. *Therapie* 2004; 59: 471-5.
- Bakhtiarzadeh F, Siavoshi F, Gheibi S, Kashfi K, Samadi R, Jeddi S, et al. Effects of long-term oral nitrate administration on adiposity in normal adult female rats. *Life Sci* 2018; 210: 76-85.
- program NT. Toxicology and carcinogenesis studies of sodium nitrite (CAS NO. 7632-00-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies). National Toxicology Program technical report series 2001; 495: 7.
- Til HP, Kuper CF, Falke HE. Nitrite-induced adrenal effects in rats and the consequences for the no-observed-effect level. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 349-55.
- Bahadoran Z, Jeddi S, Gheibi S, Mirmiran P, Kashfi K, Ghasemi A. Inorganic nitrate, a natural anti-obesity agent: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *EXCLI J* 2020; 19: 972-83.
- Kapil V MA, Okorie M, Maleki-Toyserkani S, Akram F, Rehman F, Arghandawi S, et al. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension* 2010; 56: 274-81.
- Carlstrom M, Larsen FJ, Nystrom T, Hezel M, Borniquel S, Weitzberg E, et al. Dietary inorganic nitrate reverses features of metabolic syndrome in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 17716-20.
- Varzandi T, Abdollahifar MA, Haeri Rohani SA, Piryaee A, Zadeh-Vakili A, Jeddi S, et al. Effect of long-term nitrite administration on browning of white adipose tissue in type 2 diabetic rats: A stereological study. *Life Sciences* 2018; 207: 219-26.
- Roberts LD, Ashmore T, Kotwica AO, Murfitt SA, Fernandez BO, Feelisch M, et al. Inorganic nitrate promotes the browning of white adipose tissue through the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Diabetes* 2015; 64: 471-84.

از یافته‌های این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که تجویز نیترات در موش صحرائی سالم ماده سبب بهبود عملکرد کلیه می‌گردد؛ این اثرات مفید می‌تواند ناشی از افزایش سطح سرمی و بافتی NOx باشد. این یافته‌ها ممکن است به طور بالقوه برای کاهش بیماری‌های کلوی و بیماری‌های مرتبط با آن در انسان دارای کاربرد باشد.

29. Owen RA, Heywood R. Age-related variations in renal structure and function in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 1986; 14: 158-67.
30. Friedman SA, Raizner AE, Rosen H, Solomon NA, Sy W. Functional defects in the aging kidney. *Ann Int Med* 1972; 76: 41-5.
31. Anderson S, Brenner BM. Effects of aging on the renal glomerulus. *Am J Med* 1986; 80: 435-42.
32. Peake M, Whiting M. Measurement of serum creatinine-current status and future goals. *Clin Biochem Rev* 2006; 27: 173-84.
33. Park YJ, Kim J-M. Klotho and Postmenopausal Hormone Replacement Therapy in Women with Chronic Kidney Disease. *J Menopausal Med* 2018; 24: 75-80.
34. Carrero JJ, Hecking M, Chesnaye NC, Jager KJ. Sex and gender disparities in the epidemiology and outcomes of chronic kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* 2018; 14: 151-64.
35. Rogers JL, Mitchell AR, Maric C, Sandberg K, Myers A, Mulrone SE. Effect of sex hormones on renal estrogen and angiotensin type 1 receptors in female and male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R794-9.
36. Baylis C. Sexual dimorphism in the aging kidney: differences in the nitric oxide system. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5: 384-96.
37. Schulze F, Maas R, Freese R, Schwedhelm E, Silberhorn E, Böger RH. Determination of a reference value for N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine in 500 subjects. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 622-6.
38. Reckelhoff JF, Baylis C. Glomerular metalloprotease activity in the aging rat kidney: inverse correlation with injury. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1835-8.
39. Kanematsu Y, Yamaguchi K, Ohnishi H, Motobayashi Y, Ishizawa K, Izawa Y, et al. Dietary doses of nitrite restore circulating nitric oxide level and improve renal injury in l-NAME-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F1457-F62.
40. Baylis C, Mitruka B, Deng A. Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest* 1992; 90: 278-81.
41. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 2001; 20: 6008-16.
42. Wang W, Jittikanont S, Falk SA, Li P, Feng L, Gengaro PE, et al. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F532-7.
43. Delles C, Klingbeil AU, Schneider MP, Handrock R, Schäufele T, Schmieder RE. The role of nitric oxide in the regulation of glomerular haemodynamics in humans. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1392-7.
44. Jin XH, Siragy HM, Carey RM. Renal interstitial cGMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism. *Hypertension* 2001; 38: 309-16.

Original Article

## Effect of Long-term Nitrate Administration on Kidney Function in Female Rats

Jeddi S , Yousefzadeh N , Ghasemi A 

Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: Ghasemi@endocrine.ac.ir

Received: 19/12/2021 Accepted: 23/08/2021

**Abstract**

**Introduction:** Despite the higher prevalence of kidney dysfunction in females, the effects of nitrate have mainly been studied in males. This study aimed to determine the effects of long-term sodium nitrate administration on kidney function in normal adult female rats by assessing estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR), serum urea, and serum creatinine. **Materials and Methods:** Female Wistar rats were divided into two groups (n = 10 per group). The control group received tap water, and the nitrate group received tap water containing 100 mg/L sodium nitrate for nine months. Bodyweight, serum urea, and serum creatinine were measured at the beginning and end of the study, and eGFR was calculated. The nitric oxide metabolites (NOx) levels were also measured at the end of the study in serum and kidney tissue. **Results:** The body weight, serum urea, and creatinine levels of rats in the control group were significantly higher, and eGFR was significantly lower at the end of the study compared to the beginning of the study. Nitrate administration for nine months prevented increases in body weight, serum urea, and creatinine and decreases in eGFR. Nitrate-treated female rats also had higher NOx levels in serum and kidney tissue. **Conclusion:** Nitrate administration improved kidney function in female normal adult rats. These beneficial effects may be associated with increased serum and kidney levels of NOx.

**Keywords:** Kidney Function, Nitrate, Nitric Oxide, Estimated Glomerular Filtration Rate