

## *Effect of Dexamethasone on Glycocalyx Injury and Endothelin (ET)-B Receptor Gene Expression in Liver Tissue during Hepatic Warm Ischemia/Reperfusion in Rats*

Amir Valizadeh-Dizajeykan<sup>1</sup>,

Kasra Ghanaat<sup>1</sup>,

Soheil Azizi<sup>2</sup>,

Majid Malekzadeh-Shafaroudi<sup>3</sup>,

Abbas Khonakdar-Tarsi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> MSc Student in Biochemistry, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Paramedicine, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Anatomy and Cell Biology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Molecular and Cell Biology Research Center, Department of Biochemistry and Genetics, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 22, 2015 Accepted February 13, 2016)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Damage caused by ischemia/reperfusion (I/R) is one of the major causes of liver failure during surgeries. Endothelin as the main vasoconstrictor has two receptors; ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub>. Increased number of ET<sub>B</sub> during ischemia-reperfusion, reduces tissue damages by sinusoidal dilation. This study investigated the effects of dexamethasone against liver endothelial glycocalyx injury and ET<sub>B</sub> receptor gene expression during hepatic ischemia/reperfusion in rats.

**Materials and methods:** Thirty two male Wistar rats were divided into four groups; a SHAM-operated group that received normal saline, DEX; which had dexamethasone injection (10 mg/kg), the I/R; received normal saline during ischemia/reperfusion, and the DEX + IR with I/R that received dexamethasone (10 mg/kg, 60 minutes before ischemia and immediately after reperfusion). After 1 hour of ischemia and 3 hours of reperfusion the blood samples and liver tissues were collected. The relative gene expression of ET<sub>B</sub> was assessed by real time PCR. Serum samples were used to measure the level of ALT and AST and hyaluronic acid (HA).

**Results:** The level of ALT, AST and HA significantly increased in I/R compared with those of the SHAM-operated group (P<0.001). Injection of dexamethasone in the DEX+IR caused a significant reduction in serum indicators compared to those of the I/R group (P<0.001). Elevated ET<sub>B</sub> receptor gene expression reduced by dexamethasone injection (P> 0.05).

**Conclusion:** Dexamethasone decreased ET<sub>B</sub> receptor gene expression during liver I/R. In addition, it significantly protected the parenchymal cells and sinusoidal endothelial glycocalyx. Therefore, dexamethasone could play an important role in reducing liver injury during I/R.

**Keywords:** ischemia, dexamethasone, endothelin-B receptor, Glycocalyx

# اثر دگزامتازون بر آسیب گلیکوکالیکس بافت کبد و بیان ژن گیرنده نوع B اندوتلین طی ایسکمی-ریپرفیوژن کبدی در رت

امیر ولیزاده دیزجیکان<sup>۱</sup>

کسری قناعت<sup>۱</sup>

سهیل عزیزی<sup>۲</sup>

مجید ملک زاده شفارودی<sup>۳</sup>

عباس خنکدار طارسی<sup>۴</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** آسیب ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن (I/R) یکی از علل اساسی نارسایی کبدی طی جراحی‌ها می‌باشد. اندوتلین، مهم‌ترین منقبض‌کننده عروقی، دو نوع گیرنده ET<sub>A</sub> و ET<sub>B</sub> دارد که افزایش تعداد گیرنده B، با اتساع سینوزویدها، التهاب و تخریب بافت کبد را کاهش می‌دهد. در این مطالعه اثر دگزامتازون بر آسیب گلیکوکالیکس و بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub> بافت کبد طی I/R گرم کبدی در رت بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** رت‌های نر ویستار به چهار گروه هشت تایی تقسیم شدند: به گروه SHAM سالین، به گروه DEX، دگزامتازون (۱۰ mg/kg)، به گروه I/R طی ایسکمی-ریپرفیوژن کبدی سالین و به گروه DEX+IR دگزامتازون (۱۰ mg/kg)، ۶۰ دقیقه قبل ایسکمی و بلافاصله بعد از ریپرفیوژن به صورت تک دوز) تزریق شد. پس از ۱ ساعت ایسکمی و ۳ ساعت ریپرفیوژن، خون و بافت کبدی جمع‌آوری شدند. برای ارزیابی بیان نسبی ژن ET<sub>B</sub>، از real time PCR استفاده شد. میزان ALT، AST و هیالورونیک اسید (HA) در سرم اندازه‌گیری شدند.

**یافته‌ها:** میزان ALT، AST و HA در I/R افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه SHAM نشان داد ( $p < 0.001$ ). تزریق دگزامتازون در DEX+IR کاهش معنی‌دار را در مقدار سرمی شاخص‌های فوق در مقایسه با گروه I/R سبب شد ( $p < 0.001$ ). بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub> با تزریق دگزامتازون کاهش یافت ( $p > 0.05$ ).

**استنتاج:** دگزامتازون بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub> را طی I/R کبدی کاهش می‌دهد و سلول‌های پارانشیم و گلیکوکالیکس اندوتلیوم سینوزویدی را در مقابل آسیب I/R محافظت می‌کند. بنابراین دگزامتازون می‌تواند در کاهش آسیب ناشی از I/R کبدی نقش داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ایسکمی-ریپرفیوژن، دگزامتازون، گیرنده اندوتلین-B، گلیکوکالیکس

## مقدمه

پیوند کبد می‌باشد(۱). آسیب I/R در نتیجه آسیب سلولی ناشی از هیپوکسی و عدم تأمین دوباره اکسیژن و پیدایش واسطه‌های التهابی مختلف رخ می‌دهد(۲). در

ایسکمی-ریپرفیوژن Ischemia/reperfusion یکی از علل اساسی نارسایی کبدی در شرایط مختلف پاتولوژیکی از جمله جراحی، عفونت، تروما و

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۰۲۵ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تأمین شده است.

**مؤلف مسئول:** عباس خنکدار طارسی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده خزر آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی E-mail : khonakdarab@gmail.com

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، گروه بیوشیمی-بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۰/۱۲ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۱/۲۴

واقع نارسایی در جریان خون میکروسکوپی کبد، علت اصلی پیدایش آسیب I/R در کبد می‌باشد. این نارسایی در سلول‌هایی که به طور پیوسته وابسته به تأمین خون و اکسیژن هستند، رخ می‌دهد (۳). وقایع پیام‌رسانی موضعی کمک‌کننده به آسیب سلول‌های کبدی پیچیده و متنوع هستند و شامل تعامل بین هپاتوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی کبدی، سلول‌های کوپفر و سلول‌های ستاره‌ای (stellate cells) می‌باشند (۴). سلول‌های اندوتلیوم سینوزوئیدی با رهاسازی مواد گشاد کننده عروق مانند نیتریک اکسید، مونو اکسید کربن و پروستاگلین‌ها و منقبض کننده‌های عروقی مثل اندوتلین-۱ و ترومبوکسان A<sub>2</sub>، نقش اصلی را در تنظیم عملکرد عروقی ایفا می‌کند (۵). جریان خون میکروسکوپی کبد به طور معمول توسط تعادل مناسب و دقیق بین این تنگ کننده‌ها و گشاد کننده‌های عروقی تنظیم می‌شود اما تحت شرایط I/R این تعادل برهم می‌خورد که نتیجه آن اختلال در تنظیم جریان خون کبدی می‌باشد (۶، ۷). مرحله بعد از ایسکمی-ریپرفیوژن، بر اساس منشاء گونه‌های واکنش گر اکسیژن / نیتروژن به سه فاز تقسیم می‌گردد: فاز فوق حاد (در میتوکندری)، فاز حاد (در سلول‌های کوپفر) و فاز مزمن (در نوتروفیل). طی ریپرفیوژن محل تولید گونه‌های واکنش گر اکسیژن/نیتروژن (ROS/RNS) با تغییر از فاز فوق حاد، به فاز حاد و مزمن، از میتوکندری به عروق خونی تغییر مکان می‌دهند. طی فاز بعدی، سلول‌های کوپفر و نوتروفیل‌های جاذب شیمیایی چندین گونه واکنش گر را تولید می‌کنند که از طریق تغییرات شیمیایی و تجزیه گلیکوکالیکس سبب تشدید آسیب و التهاب کبدی می‌گردد (۸). در شرایط طبیعی گلیکوکالیکس تولید شده به وسیله سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی نقش فعالی در حفظ همئوستاز عروقی ایفا می‌کند. در شرایط پاتولوژیک نظیر I/R گونه‌های واکنش گر اکسیژن (ROS) به گلیکوکالیکس حمله می‌کنند و سبب تخریب آن می‌گردند. هیالورونیک اسید یکی از اجزای

تشکیل دهنده گلیکوکالیکس است که در نتیجه آسیب سلول‌های اندوتلیال وارد خون می‌گردد. بنابراین اندازه گیری این مولکول در سرم یک روش مناسب برای ارزیابی آسیب کبد و به خصوص آسیب اندوتلیوم سینوزوئیدها در بیماری‌های کبدی می‌باشد. ایسکمی سلول‌های کوپفر را فعال می‌کند که منبع اصلی تشکیل گونه‌های واکنش گر اکسیژن و سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF- $\alpha$  و IL-1 طی دوره برقراری مجدد جریان خون می‌باشند (۹-۱۱). این ترکیبات می‌توانند با ایجاد فرآیندهای التهابی سبب تخریب سلول‌های کبد شوند که در نتیجه آن بسیاری از اعمال بافتی مختل می‌شوند. در کنار التهاب و تورم سلولی، تعادل بین نیتریک اکسید و اندوتلین از بین می‌رود به این صورت که تولید اندوتلین افزایش می‌یابد (۱۲، ۱۳). اندوتلین دارای سه ایزوفرم 1، 2، 3-ET از یک خانواده پپتیدی ۲۱ اسید آمینه‌ای می‌باشد که هر یک به وسیله ژن خاصی کد می‌شود (۱۴، ۱۵) و بیشترین مقدار آن توسط سلول‌های اندوتلیال عروق تولید و به گیرنده‌های خود بر روی عضلات صاف متصل می‌شود (۷). کبد یکی از محل‌های اصلی سنتز و فعالیت اندوتلین می‌باشد (۱۶). اندوتلین دارای دو گیرنده به نام‌های ET<sub>A</sub> و ET<sub>B</sub> می‌باشد، گیرنده ET<sub>B</sub> به عنوان گیرنده کلیرانس، در خارج کردن ET-1 از پلاسما به ویژه در ریه‌ها نیز نقش دارد (۱۷). تمایل اتصال ایزوفرم‌های اندوتلین به گیرنده‌هایش متفاوت می‌باشد، بدین صورت که گیرنده ET<sub>A</sub> تمایل بالایی برای اتصال به ET-1 و ET-2 و تمایل ضعیفی به ET-3 دارد درحالی که گیرنده ET<sub>B</sub> به هر سه نوع اندوتلین با تمایل یکسانی متصل می‌شود (۱۵، ۱۶، ۱۸، ۱۹). با توجه به این که علت اصلی آسیب بافت کبد بعد از ریپرفیوژن، انقباض یا تنگی سینوزوئیدها و برقرار نشدن خون کافی در بافت است و افزایش بیان ژن‌های گیرنده‌های اندوتلین نیز هم سو با افزایش بیان ژن اندوتلین-۱ رخ می‌دهد (۱۶)، به نظر می‌رسد اندوتلین و گیرنده‌های آن در آسیب I/R نقش اساسی داشته باشند.

چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. مسائل اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی در هنگام جراحی بر اساس اصول اخلاقی کار با حیوانات رعایت شد تا حد الامکان موجب درد و رنج حیوان نگردد. این ۳۲ رت به طور تصادفی در چهار گروه هشت تایی قرار گرفتند:

۱- گروهی که همراه با جراحی سالی ۹/۰ درصد دریافت کردند، در واقع این گروه، گروه کنترل است (SHAM).

۲- گروهی که همراه با جراحی دگزامتازون دریافت کردند (DEX).

۳- گروهی که همراه با جراحی و I/R، سالی دریافت کردند (I/R).

۴- گروهی که همراه با جراحی و I/R، دگزامتازون دریافت کردند (DEX+I/R).

#### روش ایجاد ایسکمی

رت‌ها به مدت ۱۸ ساعت قبل از جراحی ناشتا نگهداشته شدند اما آب آشامیدنی در دسترس آن‌ها قرار گرفت. رت‌ها به وسیله کتامین (۶۰ mg/kg, i.p) و زایلازین (۱۰ mg/kg, i.p) بیهوش شدند. سپس روی خط میانی شکم یک برش طولی از زیر ناحیه جناغ به اندازه ۲ سانتی متر ایجاد شد و پس از کنار زدن فاسیا و برش عضله رکتوس شکم، کبد نمایان شد. اتصالات بین کبد و دیافراگم صفاقی بریده و با فشار ملایم دو دست در طرفین ناحیه برش، کبد از حفره شکم خارج شد. شاخه‌های چپ ورید پورت و شریان کبدی برای ایسکمی کامل لوب‌های میانی و چپ کبدی با کلمپ بولداگ مسدود شدند اما لوب راست برای جلوگیری از احتقان روده‌ای مسدود نشد (۱۱). بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، گیره برای برقراری مجدد جریان خون برداشته شد. در تمام مدت ایسکمی کبد توسط گاز استریل آغشته به سالی نرمال مرطوب نگه‌داشته شد تا از دهیدراتاسیون حیوان جلوگیری به عمل آید. پس از طی

اما با در نظر گرفتن این نکته که گیرنده نوع A انقباض و نوع B شل شدن سلول‌های Stellate (این سلول‌ها میزان اتساع سینوزوئیدی را تنظیم می‌کنند) مستقر در جدار سینوزوئیدهای کبدی را سبب می‌شود، اگر افزایش پاتولوژیک بیان ژن‌های فوق به گونه‌ای تغییر داده شود که بیان گیرنده نوع B افزایش داده شود یا بیان افزایش یافته آن طی I/R تغییر نکند، می‌توان از آسیب ناشی از I/R وابسته به افزایش اندوتلین و گیرنده‌هایش جلوگیری نمود. بنابراین عواملی که بتوانند با کاهش بیان ژن‌های ET و گیرنده نوع A و افزایش بیان گیرنده نوع B سبب اتساع عروق یا مانع از انقباض آن‌ها شوند و از تولید واسطه‌های پیش التهابی ممانعت به عمل آورند، عوامل مفیدی برای جلوگیری از آسیب بافت کبد ناشی از I/R خواهند بود. دگزامتازون (DEX) یک داروی ضد التهاب کورتیکو استروئیدی است که در شرایط مختلف پاتولوژیک برای مهار التهاب و سرکوب سیستم ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰). DEX به دلیل داشتن نقش‌های فیزیولوژیک متنوع، گزینه مناسبی برای اهداف فوق به نظر می‌رسد و پژوهش‌های متعددی برای ارزیابی خواص آن در مهار آسیب بافت کبدی ناشی از I/R در کبد و سایر بافت‌ها در حال انجام می‌باشد. در این مطالعه اثر DEX بر بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub> و آسیب گلیکوکالیکس سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی بافت کبد مورد ارزیابی قرار گرفت. مزیت مطالعه حاضر این است که تاکنون بررسی مشابهی در ارتباط با مکانیسم اثر دگزامتازون در کاهش آسیب ناشی از I/R از طریق اثر آن بر بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub> و مهار آسیب گلیکوکالیکس انجام نشده است.

#### مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی سی و دو رت نر Wistar از مرکز مطالعات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی مازندران با وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم به طور تصادفی انتخاب شدند. این حیوانات با دمای  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  و رطوبت  $55 \pm 5\%$  درصد با

ژن  $70^{\circ}\text{C}$  و تعداد سیکل ۴۰ بود. مرحله انکوباسیون مقدماتی به مدت ۲ دقیقه در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  انجام گرفت (بر اساس پروتکل سازنده کیت) و برای جلوگیری از انتقال آلودگی از یوراسیل-N- گلیکوزیلاز (UNG) استفاده شد. UNG تمامی محصولات غیر اختصاصی PCR را که حاوی dUMP باشد، تخریب می نماید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  جهت دناتوراسیون و در نهایت به مدت 15s در دمای  $94^{\circ}\text{C}$ ، 30s در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  و 30s هم در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  با تعداد سیکل های ۴۰ قرار گرفت. نمودار استاندارد برای تعیین کارایی  $\beta$ -actin PCR (efficiency) رسم شد. به عنوان ژن کنترل استفاده شد.

جدول شماره ۱: توالی اختصاصی پرایمر گیرنده  $\text{ET}_B$  و بتا-اکتین) این پرایمرها با استفاده از نرم افزار Allel ID7 و توالی ژن های مربوط طراحی و سنتز شدند)

Gene	Primer sequence 5'→3'	Product length (bp)
$\text{ET}_B$	Sense : 5'-TTCACCTCAGCAGGATTCTG-3' Antisense: 5'-AGGTGTGGAAAGTTAGAACG-3'	۳۷۴
$\beta$ -actin	Sense : 5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3' Antisense: 5'-TTTAAATGTCACGCACGATTTC-3'	۱۴۵

اندازه گیری هیالورونیک اسید

اندازه گیری سطوح هیالورونیک اسید در سرم یک روش مناسب برای ارزیابی آسیب کبدی می باشد. اندازه گیری آن با استفاده از کیت الیزا ( R&D systems<sup>TM</sup> a bio-techne brand, USA) و با استفاده از پروتکل کیت شرکت سازنده انجام شد.

تعیین فعالیت آلانین آمینو ترانسفراز و آسپارات آمینو ترانسفراز

آنزیم های ALT و AST به عنوان آنزیم های شاخص در آسیب های بافت پارانشیم کبد به خون آزاد می شوند و غلظت آن ها در خون افزایش می یابد. از این رو جهت تعیین میزان شدت آسیب بافت پارانشیم کبدی اندازه گیری میزان فعالیت این آنزیم ها در سرم با ارزش می باشد. مقادیر ALT و AST با استفاده از کیت پارس آزمون (کرج، ایران) و پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

زمان ایسکمی گیره به آهستگی برداشته و کبد به داخل حفره شکمی منتقل و محل برش بخیه شد. حیوانات شاهد به روش مشابهی آماده شدند، اما گیره روی عروق لوب های چپ و میانی آن ها قرار نگرفت. بعد از ۳ ساعت از شروع ریپرفیوژن، رت ها کشته، سرم حاصل از خون و بافت ایسکمیک آن ها جمع آوری و تا زمان انجام بررسی ها در دمای  $70^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند. دگرآماتازون (شرکت داروسازی اسوه،  $8\text{ mg}/2\text{ ml}$ ) به صورت داخل صفاقی دو بار با دوز  $8\text{ mg}/\text{kg}$  (۲۱)، دقیقاً ۶۰ دقیقه قبل از ایسکمی و با همین دوز بلافاصله بعد از ریپرفیوژن تزریق شدند.

#### جداسازی و تخلیص RNA

جداسازی RNA سلولی از بافت های کبدی با استفاده از کیت RNeasy plus mini kit (Qiagen) و با توجه به پروتکل شرکت سازنده انجام شد. سپس غلظت RNA های استخراج شده با اسپکتروفتومتری UV یا همان نانودراپ ( Biowave WPA, biochrom, England) در نسبت طول موج  $260/280$  برحسب  $\text{ng}/\mu\text{L}$  تعیین شد. کیفیت RNA تخلیص شده توسط الکتروفورز ژل آگارز  $1/5$  درصد با رنگ آمیزی سایبرگرین برای تعیین باندهای RNA مورد بررسی قرار گرفت و دو باند 18s و 28s مشاهده شدند و آلودگی DNA نیز مشاهده نشد.

بررسی بیان نسبی ژن  $\text{ET}_B$  با استفاده از *real-time PCR* جهت بررسی بیان نسبی ژن، ابتدا با استفاده از RNA استخراج شده و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس cDNA سنتز شد (dART RT kit ERUx, Poland). *real-time PCR* (BIO-RAD, iQ5, Malaysia) برای ژن  $\text{ET}_B$  با استفاده از کیت ( SG qPCR Master Mix ) ERUx, Poland (2X) و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن گیرنده  $\text{ET}_B$  (جدول شماره ۱) با این صورت انجام شد: طول توالی تکثیر شده (آمپلیکون) bp ۴۷۴ و دمای اتصال (annealing) آن به توالی هدف در

## مطالعات هیستوپاتولوژی

در این مطالعه پس از قرار دادن نمونه‌های بافت کبد در فرمالین ۱۰ درصد، برش‌های ۵ میکرونی توسط دستگاه میکروتوم از آن‌ها تهیه و رنگ آمیزی برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد.

## آنالیز آماری

تمام نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار میانگین (Mean $\pm$ S.E.M) بیان شدند. تفاوت میانگین گروه‌ها توسط آزمون One-way ANOVA و Tukey multiple comparison در نرم افزار SPSS 13 تعیین شد و سطح معنی دار بودن  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از Real time PCR با استفاده از نرم افزار Linreg و Rest-rg آنالیز شدند.

## یافته‌ها

## آسیب کبدی

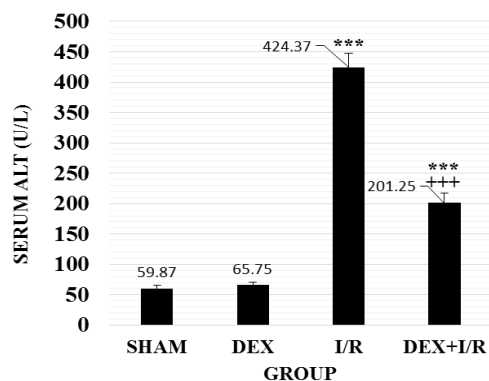
افزایش ALT و AST سرمی منعکس کننده تخریب سلول‌های پارانشیم کبدی است. در نمودار شماره ۱ و ۲ سطح سرمی ALT و AST نشان داده شده است. میانگین مقادیر ALT و AST در گروه کنترل به ترتیب  $59.87 \pm 6.32$  U/L و  $230.25 \pm 18.74$  U/L اندازه گیری شد. سطح این آمینوترانسفرازها به طور معنی داری ( $p < 0.001$ ) در گروه I/R به ترتیب  $424.37 \pm 22.99$  U/L و  $858.12 \pm 58.11$  U/L افزایش یافت.

سطح ALT و AST پس از تجویز دگزامتازون در گروه DEX+I/R به مقادیر  $201.25 \pm 15.62$  U/L و  $300.87 \pm 18.02$  U/L به طور معنی داری ( $p < 0.001$ ) کاهش یافت.

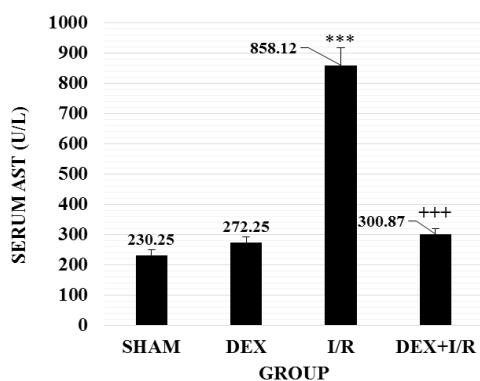
ارزیابی آسیب گلیکوکالیکس اندوتلیوم سینوزوئیدی (اندازه گیری HA)

نمودار شماره ۳ نشان می‌دهد که سطح HA به طور معنی داری ( $p < 0.001$ ) در گروه

I/R ( $43.83 \pm 3.73$  ng/ml) نسبت به گروه SHAM ( $5.52 \pm 1.03$  ng/ml) افزایش می‌یابد. بعد از تزریق DEX سطح HA به طور معنی داری ( $p < 0.001$ ) در گروه DEX+I/R ( $11.98 \pm 1.83$  ng/ml) نسبت به گروه I/R کاهش نشان داد.



نمودار شماره ۱: اثر دگزامتازون بر فعالیت ALT سرمی پس از I/R کبدی. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار میانگین (Mean $\pm$ S.E.M) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شده‌اند. \*\*\* اختلاف معنی دار نسبت به گروه SHAM ( $P < 0.001$ ) و \*\*\* اختلاف معنی دار را نسبت به گروه I/R ( $P < 0.001$ ) نشان می‌دهد. SHAM، گروه کنترلی که سالی‌ن نرمال دریافت نمود؛ DEX، گروهی که دگزامتازون دریافت نمود؛ I/R، گروهی که طی ایسکمی-ریپرفیوژن سالی‌ن نرمال و DEX+I/R، گروه I/R که DEX دریافت کرد.



نمودار شماره ۲: اثر دگزامتازون بر فعالیت AST سرمی پس از I/R کبدی. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار میانگین (Mean $\pm$ S.E.M) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شده‌اند. \*\*\* اختلاف معنی دار نسبت به گروه SHAM ( $P < 0.001$ ) و \*\*\* اختلاف معنی دار را نسبت به گروه I/R ( $P < 0.001$ ) نشان می‌دهد. SHAM، گروه کنترلی که سالی‌ن نرمال دریافت نمود؛ DEX، گروهی که دگزامتازون دریافت نمود؛ I/R، گروهی که طی ایسکمی-ریپرفیوژن سالی‌ن نرمال و DEX+I/R، گروه I/R که DEX دریافت کرد.

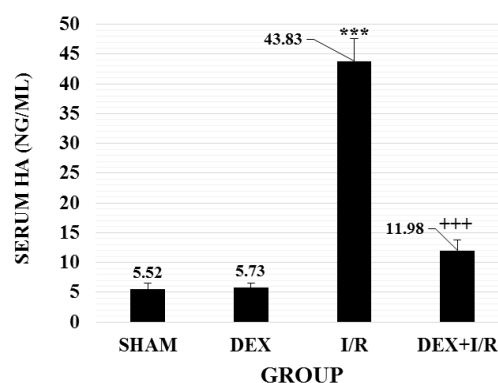
معیار میانگین (Mean± S.E.M) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شده‌اند. \*\*\* اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه SHAM ( $P < 0.001$ )، گروه کنترلی که سالین نرمال دریافت نمود؛ DEX، گروهی که دگزامتازون دریافت نمود؛ I/R، گروهی که طی ایسکمی-ریپرفیوژن سالین نرمال و DEX+I/R، گروه I/R که DEX دریافت کرد.

#### هیستوپاتولوژی کبد

در گروه کنترل (SHAM) سلول‌های کبدی با هسته‌های گرد روشن و هستک‌های واضح با حدود سلولی معین به صورت طناب‌های سلولی مشاهده شدند. سینوزوئیدهای کبدی نرمال بودند. دانسیته سلول‌های کوپفر نیز طبیعی بوده است. اندوتلیوم جدار وریدهای مرکز کبدی نیز به خوبی مشخص بودند. سلول‌ها در ناحیه ۳ لوبول کلاسیک کبدی (نزدیک به ورید مرکز لوبولی) از سلامت بالایی برخوردار بودند. این ناحیه که ناحیه ایسکمیک کبدی است (کم‌تر اکسیژن دریافت می‌نماید) عمدتاً به عنوان شاخصی در تعیین سلامت نمونه کبدی به کار می‌رود. هپاتوسیت‌ها در ناحیه ۱ عمدتاً با هسته‌های تیره‌تر و سیتوپلاسم رنگ‌پذیرتر مشاهده می‌شوند (تصویر شماره ۱، الف، ب).

در گروه دوم (DEX) (دریافت کننده دگزامتازون بدون ایسکمی بافتی) هپاتوسیت‌های کبد با هسته‌های روشن و هستک‌های واضح هم‌چنان به خصوص در ناحیه ۳ نزدیک و اطراف مشاهده شدند. سینوزوئیدهای کبد واضح بودند. تعداد زیادی سلول‌های کوپفر (ماکروفازهای ویژه کبد) در فضاهای سینوزوئیدی با تراکم بیش‌تری نسبت به گروه کنترل مشاهده گشتند که حاوی گرانول‌های تیره بلعیده شده بودند. اندوتلیوم عروقی در بافت کبدی چه در فضاهای سینوزوئیدی و چه در ورید مرکز لوبولی دچار ریزش شدند و دیواره‌های عروقی اغلب صدمه دیده بودند (تصویر شماره ۱، ج، د)

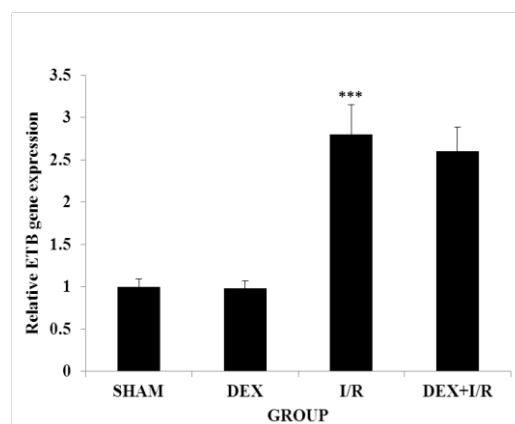
طناب‌های سلولی کبدی در گروه سوم (I/R) در بسیاری از بخش‌ها در هر سه ناحیه از یکدیگر گسسته



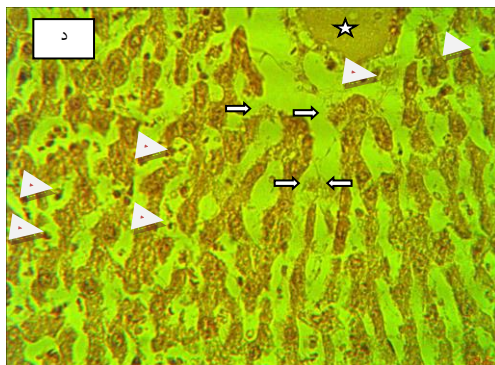
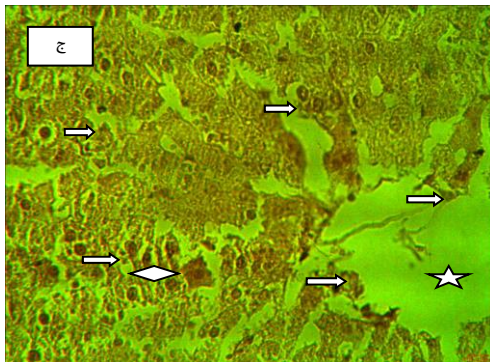
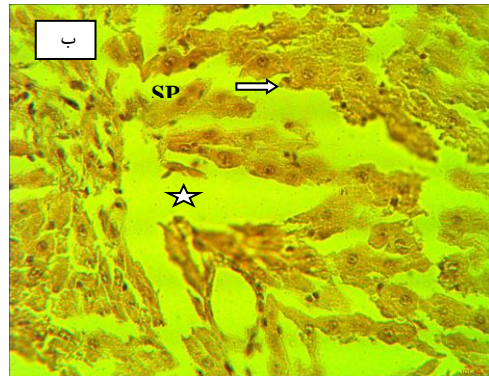
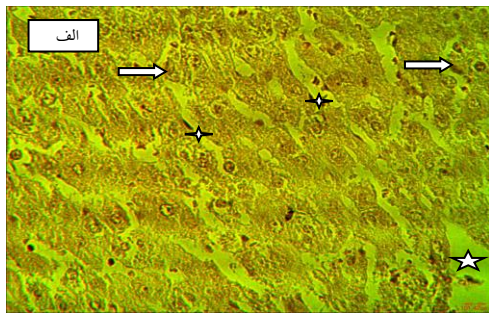
نمودار شماره ۳: اثر دگزامتازون بر مقدار هیالورونیک اسید (HA) (نانوگرم در میلی‌لیتر) سرمی پس از I/R کبدی. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار میانگین (Mean± S.E.M) با ۸ رت در هر گروه نشان داده شده‌اند. \*\*\* اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه SHAM ( $P < 0.001$ ) و +++ اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه I/R ( $p < 0.001$ ) نشان می‌دهد. SHAM، گروه کنترلی که سالین نرمال دریافت نمود؛ DEX، گروهی که دگزامتازون دریافت نمود؛ I/R، گروهی که طی ایسکمی-ریپرفیوژن سالین نرمال و DEX+I/R، گروه I/R که DEX دریافت کرد.

#### بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub>

آنالیز بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub> در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است. در مقایسه با گروه SHAM و DEX، بیان گیرنده ET<sub>B</sub> در گروه I/R، افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.001$ ). بیان mRNA گیرنده ET<sub>B</sub> در گروه DEX±I/R در اثر درمان با دگزامتازون به طور غیر معنی‌داری ( $p > 0.05$ ) کاهش یافت.



نمودار شماره ۴: تغییر بیان ژن گیرنده ET<sub>B</sub> بافت کبدی پس از I/R کبدی به وسیله دگزامتازون. نتایج به صورت میانگین ± انحراف



تصویر شماره ۱: برش هیستولوژیک کبد در گروه‌های چهارگانه مورد مطالعه. الف) گروه SHAM: سلول‌های کبدی با هسته‌های گرد روشن و واضح با حدود سلولی معین به صورت طناب‌های سلولی موسوم به طناب‌های رماک مشاهده می‌شوند. سینوزوئیدهای کبدی نرمال می‌باشند. دانسیته سلول‌های کوپفر (فلش‌های توپر سفیدرنگ) نیز طبیعی است. اندوتلیوم جدار سینوزوئیدهای کبدی (ستاره چهارپر) نیز به خوبی مشخص هستند.

شدند. با درشت‌نمایی بالاتری می‌توان آتروفی هپاتوسیت‌ها را اغلب در مناطق ۱ و ۳ مشاهده نمود. این موضوع به معنی تخریب بافت کبدی در هر سه ناحیه بوده است. شدت تخریب در ناحیه ۱ و ۳ و به خصوص سرایت تخریب به ناحیه ۳ (ناحیه کم اکسیژن) مشخص بوده است. فعالیت وسیع کوپفرهای کبدی (فلش‌های سفیدرنگ) در جهت بلع و هضم سلول‌های تخریب شده چشمگیر بود. اندوتلیوم عروقی اغلب دچار ریزش شده بود. ارتشاح لکوسیتی به همراه تعداد زیادی کوپفرهای بلع‌کننده پیگمان تیره در فضای سینوزوئیدهای کبدی قابل مشاهده بوده است. سلول‌های ژاننت (لوزی) پررنگ با سیتوپلاسمی قرمز رنگ و هسته کروی خارج از مرکز در فضای سینوزوئیدی و هم در وریدهای مرکز لوبولی مشاهده شدند. این سلول‌ها، لنفوسیت‌های بزرگی هستند که تنها در شرایط مرضی در خون ظاهر می‌شوند (تصویر شماره ۱، ه و).

در گروه چهارم (DEX+I/R) (دریافت دگزامتازون همراه با ایسکمی کبدی) هپاتوسیت‌های کبدی در ناحیه ۱ لوبول کلاسیک کبدی اغلب دچار آسیب و هسته‌های سلولی به کناری رانده شده بودند. اما هسته‌ها همگی گرد و شفاف با هستک‌های واضح بودند. در ناحیه ۳ نزدیک به central vein سلول‌ها مورفولوژی سالمی را از خود نمایان ساختند. با این حالت در ناحیه ۲ لوبول کلاسیک علائم تحریک سلولی به صورت واکنش شدن هپاتوسیت‌ها و از بین رفتن برخی مرزهای سلولی مشاهده مگردید. وجود ترشح به صورت سروزیه صورتی رنگ در فضاهای عروقی central vein (ورید مرکز لوبولی) جلب توجه می‌نمود. ارتشاح لکوسیتی از نوع گرانولوسیت‌ها به همراه تعداد زیادی سلول‌های کوپفر فعال در حال بلع در فضای میان طناب‌های رماک رناک کبدی (فضای سینوزوئیدال) جلب توجه می‌نمود (تصویر شماره ۱، ح، ط).



## بحث

آسیب کبدی ناشی از I/R مشکل اصلی بعد از جراحی های کبد می باشد. محرومیت از اکسیژن و جریان خون طی دوره ایسکمی عامل اصلی آسیب ناشی از I/R نیستند بلکه مجموعه تغییرات مولکولی که طی برقراری مجدد جریان خون (ریپرفیوژن) رخ می دهند که در نهایت تخریب سلول های کبدی را موجب می شوند (۸). I/R دارای دو فاز مجزا می باشد؛ فاز اولیه (کم تر از ۲ ساعت بعد از ریپرفیوژن) که در این فاز سلول های کوپفر و هپاتوسیت های آسیب دیده، ROS را آزاد می کنند که با افزایش سطح ترانس آمینازهای سرمی همراه می باشد. با این که در فاز اولیه آسیب محدود می باشد در نتیجه استرس اکسیداتیو، چندین سایتوکاین پیش التهابی مانند TNF- $\alpha$ ، IL-12 و IL-1 $\beta$  تولید می شوند که در فاز ثانویه، تولید آن ها شدیدتر می شود. در فاز دوم آسیب که ۶ تا ۴۸ ساعت پس از برقراری مجدد جریان خون را شامل می شود، واکنش های التهابی به وسیله نوتروفیل های موجود در محل با رهاسازی ROS، موجب آسیب به هپاتوسیت ها می شود. در مرحله اول، ROS توسط نوتروفیل های مسیر NADPH اکسیداز تولید می شوند (۲۳،۲۲،۲۴). نوتروفیل های فعال شده هم چنین الاستاز، کاتپسین G، هپاریناز، کلاژناز و آنزیم های هیدرولیتیک را نیز می توانند تولید کنند که به احتمال زیاد به طور مستقیم باعث مرگ سلول های کبدی می شوند (۲۴).

دگزامتازون به عنوان یک داروی ضد التهابی کورتیکواستروئیدی در سرکوب فرآیندهای التهابی و کاهش ROS تولید شده توسط سلول های فعال کبدی در هنگام I/R می تواند نقش مفیدی داشته باشد که باعث کاهش آسیب I/R در بافت های مختلف می شود (۲۵). غلظت AST و ALT معمولاً به عنوان شاخص های بیوشیمیایی غیر مستقیم در اندازه گیری آسیب کبدی استفاده می شوند. مطالعات متعدد نشان می دهند که سطح AST و ALT در I/R افزایش می یابد که در نتیجه آسیب غشای سلولی رخ می دهد (۲۶،۱۱). با توجه به اثر

ورید مرکز لوبولی (ستاره پنج پر) نیز با حجم وسیع خود به خوبی مشخص است. سلول ها در ناحیه ۳ لوبول کلاسیک کبدی (نزدیک به ورید مرکز لوبولی) از سلامت بالایی برخوردارند. این ناحیه که ناحیه ایسکمیک کبدی است (کم تر اکسیژن دریافت می نماید) عمدتاً به عنوان شاخصی در تعیین سلامت نمونه کبدی به کار می رود. هپاتوسیت ها در ناحیه ۱ عمدتاً با هسته های تیره تر و سیتوپلاسم رنگ پذیرتر مشاهده می شوند. (ب) گروه DEX: هپاتوسیت های کبد با هسته های روشن دارای هستک های واضح هم چنان به خصوص در ناحیه ۳ نزدیک و اطراف ورید مرکز لوبولی مشاهده می گردند. سینوزوئیدهای کبد واضح است. تعداد زیادی کوپفر (ماکروفاژ ویژه کبدی) در فضاهای سینوزوئیدی (SP) با تراکم بیش تری نسبت به گروه کنترل مشاهده می گردند که حاوی گرانول های تیره بلعیده شده می باشند. اندوتلیوم عروقی در بافت کبدی چه در فضاهای سینوزوئیدی و چه در ورید مرکز لوبولی دچار ریزش شده اند. (ج) طناب های سلولی کبدی در بسیاری از بخش ها در هر سه ناحیه از یکدیگر گسسته شده اند. با درشت نمایی بالاتری می توان آتروفی هپاتوسیت ها را اغلب در مناطق ۱ و ۳ مشاهده نمود. این موضوع به معنی تخریب بافت کبدی در هر سه ناحیه است. شدت تخریب در ناحیه ۱ و ۳ و به خصوص سرایت تخریب به ناحیه ۳ (ناحیه کم اکسیژن) مشخص است. فعالیت وسیع کوپفر های کبدی (فلش های سفید رنگ) در جهت بلع و هضم سلول های تخریب شده چشم گیر است. اندوتلیوم عروقی اغلب دچار ریزش شده است. ارتشاح لکوسیتی به همراه تعداد زیادی کوپفر های بلع کننده پیگمان تیره در فضای سینوزوئیدهای کبدی قابل مشاهده است. سلول های ژاننت (لوزی) پررنگ با سیتوپلاسمی قرمز رنگ و هسته کروی خارج از مرکز در فضای سینوزوئیدال و هم در وریدهای مرکز لوبولی مشاهده می شوند. (د) هپاتوسیت های کبدی در ناحیه ۱ لوبول کلاسیک کبدی اغلب دچار آسیب شده و هسته های سلولی به کناری رانده شده اند. هسته ها همگی گرد و شفاف با هستک های واضح هستند. در ناحیه ۳ نزدیک به ورید مرکز لوبولی سلول ها مورفولوژی سالمی را از خود نمایان می سازند. با این حالت در ناحیه ۲ لوبول کلاسیک علائم تحریک سلولی به صورت واکوئله شدن هپاتوسیت ها و از بین رفتن برخی مرزهای سلولی مشاهده می شود. وجود ترشح به صورت سروزیه صورتی رنگ (ستاره پنج پر) در فضاهای عروقی ورید مرکز لوبولی جلب توجه می نماید. ارتشاح لکوسیتی از نوع گرانولوسیتها (سر فلش تیره رنگ) به همراه تعداد زیادی سلول های کوپفر فعال (فلش سفید رنگ) در حال بلع در فضای میان طناب های رماک کبدی (فضای سینوزوئیدی) جلب توجه می نماید. رنگ آمیزی توسط هماتوکسیلین و انوزین انجام شد و تصاویر با بزرگنمایی  $\times 400$  نمایش داده شده اند.

ضدالتهابی دگرمتازون، انتظار می‌رود که این دارو از افزایش آمینوترانسفرازهای فوق پس از I/R کبدی جلوگیری نماید (۲۷). در مطالعه‌ای که توسط Eken و همکاران روی اثر وابسته به دوز دگرمتازون بر آسیب کبدی در رت انجام شد (۲۸)، آشکار شد که میزان ترانس آمینازها AST و ALT به طور قابل قبولی کاهش یافتند. در مطالعه دیگری که توسط Abo-Youssef و همکاران انجام شد، میزان فعالیت آنزیم‌های ALT و AST به طور قابل توجهی در گروه‌هایی که دگرمتازون دریافت نکرده بودند، افزایش یافته بود. دگرمتازون به طور قابل توجهی میزان ALT و AST را در گروه I/R کبدی در مقایسه با گروه کنترلی که I/R بدون دگرمتازون دریافت کرده بودند، کاهش داد (۲۰). نتایج مطالعه حاضر نیز این یافته‌ها را تأیید می‌کنند. در گروه چهارم که همراه با I/R دگرمتازون دریافت کرده بودند، میزان این ترانس آمینازها نسبت به گروه سوم که به همراه I/R سالیین دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌داری را نشان داد.

جریان خون میکروسکوپی کبد به طور معمول توسط تعادل مناسب بین تنگ کننده‌ها (ET-1) و گشاد کننده‌های عروقی (NO و CO) تنظیم می‌شود اما تحت شرایط I/R کبدی این تعادل مناسب بر هم می‌خورد و موجب اختلال در جریان خون کبدی می‌شود. ET-1 یک پپتید فعال عروقی است که هر دو نقش انقباض و شل‌کنندگی عروقی را انجام می‌دهد که این عمل را به ترتیب به واسطه دو گیرنده  $ET_A$  و  $ET_B$  انجام می‌دهد. گیرنده‌های ET در تمام سلول‌ها حضور دارند اما حضور آن‌ها در سلول‌های ستاره‌ای کبد از سایر سلول‌های سینوزوئیدی و هپاتوسیت‌ها پررنگ‌تر است (۱۶). ر اساس بسیاری از مطالعات انجام گرفته با افزایش ET-1 mRNA، یک افزایش دو برابری در سطح  $ET_B$  mRNA در I/R کبدی رخ می‌دهد (۶).

در یک مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران بر روی سلول‌های Trabecular meshwork (TM) انسانی انجام گرفت، نشان داده شد که در اثر درمان توسط

دگرمتازون بیان پروتئین گیرنده  $ET_B$  و ET-1 کاهش و همزمان سطح NO در سلول‌های TM افزایش می‌یابد (۲۹). اما نتایج این مطالعه نشان داد که دگرمتازون کاهش معنی‌داری در بیان ژن  $ET_B$  طی I/R ایجاد نمی‌کند که البته دلیل این اختلاف با نتایج مطالعه فوق می‌تواند نوع سلول و شرایط بررسی باشد که از عوامل اثرگذار بر بیان ژن‌ها هستند. علاوه بر این کاهش بیان ژن  $ET_B$  طی I/R مطلوب نیست زیرا این نوع گیرنده با وساطت اثر ET، سبب شل شدن سلول‌های Stellate و اتساع سینوزوئیدی می‌شود و بنابراین افزایش بیان آن می‌تواند به برقراری جریان خون مناسب طی ریپرفیوژن کمک نماید (۲۰). مطالعه‌ای که توسط قبادی و همکاران روی کبد رت انجام گرفت، نشان داد که دگرمتازون بیان ژن iNOS را طی I/R کبدی به میزان قابل توجهی کاهش داد (۳۰). هم‌چنین در مطالعه مشابهی که اثر دگرمتازون بر آسیب I/R کبدی در رت توسط Fouad و همکاران انجام گرفت نشان داده شد که دگرمتازون میزان بیان ژن  $TNF\ \alpha$  را به عنوان یک فاکتور پیش التهابی به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد (۲۶).

مطالعه‌ای که توسط Rubio-Gayosso و همکاران روی تغییرات گلیکوکالیکس طی I/R انجام گرفت، نشان داد که تولید ROS با سرعت زیاد علت اصلی آسیب گلیکوکالیکس ناشی از آن است. علاوه بر این اجزای گلیکوکالیکس هم دارای نقش حفاظتی در سطح سلول‌های اندوتلیال و هم نقطه مرکزی در آسیب رگ‌های کوچک طی I/R می‌باشند و اسید هیالورونیک (هیالورونان) یک نقش کلیدی در ساختار گلیکوکالیکس سطح اندوتلیوم سینوزوئیدی دارد که در نتیجه تخریب گلیکوکالیکس توسط ROS آزاد می‌شود (۳۱). همان گونه که در بخش نتایج نشان داده شد، طی I/R مقدار اسید هیالورونیک سرم به شدت افزایش می‌یابد که نشان می‌دهد طی این مجموعه واکنش‌ها، گلیکوکالیکس آسیب می‌بیند و در نتیجه تخریب آن، بخش هیالورونان به داخل خون آزاد

در این مطالعه هیستولوژی بافت کبد به منظور تعیین میزان آسیب القاء شده توسط I/R و نقش دگرامتازون در کاهش آن مورد ارزیابی قرار گرفت. مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که دگرامتازون میزان آسیب بافتی را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد که با کاهش مقادیر سرمی آنزیم‌های آمینوترانسفراز و هیالورونیک اسید هم‌سو بود. در مطالعه‌ای که توسط Fouad و همکاران روی کبد رت طی I/R انجام گرفت، نشان داده شد که تغییرات هیستوپاتولوژیکی بافت کبد به هنگام درمان توسط دگرامتازون به میزان قابل توجهی سبب کاهش آسیب بافتی می‌شود (۲۶) که تأییدکننده نتایج مطالعه حاضر می‌باشد. در پایان می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که دگرامتازون علاوه بر اثر عمومی شناخته شده‌اش در کاهش و مهار التهاب، با مکانیسم‌های دیگر نیز آسیب I/R را کاهش می‌دهد که جلوگیری از آسیب گلیکوکالیکس سطح سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی و سلول‌های پارانیشیم کبدی از طریق مهار تولید ROS را شامل می‌شود. علاوه بر این مانع از کاهش بیان ژن گیرنده اندوتلین B می‌شود و در نتیجه به برقراری جریان خون مناسب طی ریپرفیوژن در کبد کمک می‌کند.

### سپاسگزاری

از مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که با حمایت‌های مالی خود ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، کمال تشکر و قدرانی به عمل می‌آید. این مقاله از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی با شماره طرح پژوهشی ۱۰۲۵ حاصل شده است.

می‌شود. گلوکوکورتيكوئيدها می‌توانند آسیب التهابی به گلیکوکالیکس را به وسیله سرکوب تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها و هم‌چنین با جلوگیری از حرکت سلول‌های التهابی و دگرانولاسیون ماست سل‌ها محدود نمایند. در یک نمونه قلب جدا شده، هیدروکورتیزون توانست به طور قابل توجهی مانع از تخریب لایه سطحی اندوتلیال پس از ایسکمی و طی ریپرفیوژن شود و القاء TNF- $\alpha$  را کاهش دهد (۳۲). ما نیز در این مطالعه با اندازه‌گیری اسید هیالورونیک سرم نشان دادیم که دگرامتازون هم‌زمان با کاهش آسیب سلول‌های پارانیشیم کبد (کاهش ALT و AST)، میزان آسیب گلیکوکالیکس را در گروه DEX+IR به طور معنی‌داری کاهش داد (کاهش هیالورونیک اسید) که هم‌سو با نتایج مطالعات فوق می‌باشد. از آن‌جا که ROS عامل اصلی تخریب گلیکوکالیکس سطح سلول‌های اندوتلیوم سینوزوئیدی است، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که دگرامتازون می‌تواند با نقش آنتی‌اکسیدانی خود مانع از تخریب گلیکوکالیکس شود و از این طریق هم مانع از آسیب سلول‌های اندوتلیوم سینوزوئیدی می‌شود و هم از نفوذ پروتئین‌ها و نوتروفیل‌ها به خارج از سینوزوئیدها جلوگیری می‌کند که این یافته در هیچ مطالعه‌ای گزارش نشده است. علاوه بر این Greenwald و همکاران نشان دادند که نوتروفیل‌ها با تولید ROS هیالورونیک اسید مایع سینویال را تخریب می‌کنند (۳۳). هم‌چنین تقی‌زاده و همکاران نشان دادند که تجویز دگرامتازون تولید MDA را کاهش می‌دهد و پس از I/R کبدی در حفظ سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش به‌سزایی ایفا می‌کند (۳۴).

### References

- Huang H, Chen H-W, Evankovich J, Yan W, Rosborough BR, Nace GW, et al. Histones activate the NLRP3 inflammasome in Kupffer cells during sterile inflammatory liver injury. *J Immunol* 2013; 191(5): 2665-2679.
- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Piña E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147(1): 153-159.

3. Oh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection—the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(s1): 180-187.
4. Gracia-Sancho J, Villarreal Jr G, Zhang Y, Jessica XY, Liu Y, Tullius SG, et al. Flow cessation triggers endothelial dysfunction during organ cold storage conditions: strategies for pharmacologic intervention. *Transplantation* 2010; 90(2): 142-149.
5. Fernández N, Martínez MA, Climent B, García-Villalón AL, Monge L, Sanz E, et al. Coronary reactivity to endothelin-1 during partial ischemia and reperfusion in anesthetized goats. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol* 2002; 457(2): 161-168.
6. Kim Y-H, Lee S-M. Role of Kupffer cells in the vasoregulatory gene expression during hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res* 2004; 27(1): 111-117.
7. Terada Y, Tomita K, Nonoguchi H, Marumo F. Different localization of two types of endothelin receptor mRNA in microdissected rat nephron segments using reverse transcription and polymerase chain reaction assay. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 107-112.
8. van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/ reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(8): 1382-1402.
9. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284(1): G15-G26.
10. Duenschede F, Erbes K, Kircher A, Westermann S, Schad A, Riegler N, et al. Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by  $\alpha$ -lipoic acid. *Shock* 2007; 27(6): 644-651.
11. Adam ANI. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Int J Gen Med* 2014; 7: 483-489.
12. Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, Büchler M, Schemmer P, Müller M. Ischemia/ Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. *HPB Surg* 2012; 2012: 176723
13. Mendes-Braz M, Elias-Miro M, Jiménez-Castro M, Casillas-Ramirez A, Ramalho F, Peralta C. The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012.
14. Kugelmeier P, Nett PC, Zullig R, Lehmann R, Weber M, Moritz W. Expression and hypoxic regulation of the endothelin system in endocrine cells of human and rat pancreatic islets. *Jop* 2008; 9(2): 133-149.
15. Minton AZ, Phatak NR, Stankowska DL, He S, Ma H-Y, Mueller BH, et al. Endothelin B receptors contribute to retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *PloS One* 2012; 7(8): e43199.
16. Takashimizu S, Kojima S, Nishizaki Y, Kagawa T, Shiraishi K, Mine T, et al. Effect of endothelin A receptor antagonist on hepatic hemodynamics in cirrhotic rats. Implications for endothelin-1 in portal hypertension. *Tokai J Exp Clin Med* 2011; 36(2): 37-43.
17. Cherng TW, Campen MJ, Knuckles TL, Bosc LG, Kanagy NL. Impairment of coronary endothelial cell ETB receptor function after short-term inhalation exposure to whole diesel emissions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297(3): R640-R647.

18. Guan Z, Inscho EW. Endothelin and the Renal Vasculature. *Contrib Nephrol* 2011; 172: 35-49.
19. Brennan A, Dean C, Zhang A, Cass D, Mirsky R, Jessen K. Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev Biol* 2000; 227(2): 545-557.
20. Abo-Youssef AM, Messiha BA. The Protective Effect of Dexamethasone, Aspirin and Bromocriptine on Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Research Journal of Pharmacology* 2014; 8(2): 6-13.
21. Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, Patel NS, Harwood S, Mazzon E, et al. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(11): 2412-2425.
22. Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(6): G1083-G1088.
23. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32(2): 169-173.
24. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(8): 891-902.
25. Simons SS. What goes on behind closed doors: physiological versus pharmacological steroid hormone actions. *Bioessays* 2008; 30(8): 744-756.
26. Fouad AA, El-Bidawy MH, Uddin AM, Yacoubi MT. A Preliminary Study of Dexamethasone Against Ischemia/Reperfusion Liver Injury in Rats. *International Journal of Pharmacology* 2009; 5(2):155-161
27. Reagan WJ, Yang R-Z, Park S, Goldstein R, Brees D, Gong D-W. Metabolic adaptive ALT isoenzyme response in livers of C57/BL6 mice treated with dexamethasone. *Toxicol Pathol* 2012; 40(8): 1117-1127.
28. Eken H, Ozturk H, Buyukbayram H. Dose-related effects of dexamethasone on liver damage due to bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12(33): 5379-5383.
29. Zhang X, Clark AF, Yorio T. Interactions of endothelin-1 with dexamethasone in primary cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(12): 5301-5308.
30. Ghobadi M, Ghanaat K, Valizadeh-Dizgikan A, Gohari G, Roadi B, Khonakdar-Tarsi A. The Effect of Dexamethasone on Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene During Liver Warm Ischemia-reperfusion in Rat. *Res Mol Med* 2015; 3(3): 17-22.
31. Rubio-Gayosso I, Platts SH, Duling BR. Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290(6): H2247-H56.
32. Alphonsus C, Rodseth R. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* 2014; 69(7): 777-784.
33. Greenwald RA, Moak SA. Degradation of hyaluronic acid by polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 1986; 10(1): 15-30.
34. Taghizadieh M, Hajipour B, Asl NA, Khodadadi Ali SM. Co-administration of melatonin and dexamethasone attenuates lung tissue injury after liver ischemia/reperfusion. *Life Sci J* 2013; 10(6s): 314-320.