Journal of Animal Biology, Autumn 2025; 18(1):53-66

ISSN: 1735-9724

Research Article

Effects of Excitatory and Inhibitory of Nitric Oxide on Kupffer Cells and Volume of Sinusoids in Rat Liver

Mohammad Talvari[1], AtarodSadat Mostafavinia[1], Parivash Davoudi[1], Mobina Zargar[2], Seyed Mohammad Hossein Noori Mougahi[2,3*]

1- Department of Anatomical Sciences and Cognitive Neuroscience, TMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Department of Anatomy, Ahv.C., Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

*Corresponding author: noorimoo@tums.ac.ir

Received: 20 May 2025 Accepted: 27 July 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1208131

Abstract

Nitric oxide (NO) is a diatomic and lipophilic molecule that is produced by the nitric oxide synthase (Nos) from L-Arginine in many organs of the body. Considering the important roles of nitric oxide in many physiological processes of the body and limited number of researches that have been done in the field of its effects on Kupffer cells and volume of sinusoids, the purpose of this study is to evaluate excitatory and inhibitory effects of Nitric Oxide on liver histology in rat. Forty female Wistar rats with average weight of 200-250 gr after pregnancy were randomly divided into 5 groups. Except the control group, the rest of the groups intraperitoneally received Normal Saline, L-Arginine, L-NAME and mixture of L-NAME and L-Arginine respectively with the same dose in the 3th, 4th and 5th days of pregnancy. Then, in 18th day of pregnancy, Rats were anesthetized and we took out the animal's liver and examined Kupffer cells and volume of sinusoids with H-E staining and Image j methods. In this study, Kupffer cell numbers and volume of sinusoids were significantly different in L-NAME and L-Arginine groups with control group, whereas in L-NAME + Arginine group no significant difference was observed with the control group. This study showed that the combined use of L-Arginine and L-NAME can modulate the excitatory and inhibitory effects of nitric oxide on the rat liver.

Keywords: Liver, Kupffer cell, Sinusoid, Nitric Oxide, L-Arginine, L-NAME.

زیست‌شناسی جانوری، سال هجدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۴، صفحات ۶۶-۵۳

شاپا: ۹۷۲۴-۱۷۳۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات تحریکی و مهاری نیتریک‌اکساید بر تعداد سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدهای کبد موش صحرایی

محمد تلواری[۱]، عطاردالسادات مصطفوی‌نیا[۱]، پریوش داودی[۱]، مبینا زرگر[۱]، سیدمحمدحسین نوری موگهی[۲،۳*]

۱- گروه علوم تشریحی و اعصاب شناختی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۲- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه آناتومی، واحد اهواز، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: noorimoo@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۰۵

DOI: 10.60833/ascij.2025.1208131

چکیده

نیتریک‌اکساید (NO) یک مولکول دو اتمی و چربی دوست است که در بسیاری از اندام‌های بدن توسط آنزیم نیتریک‌اکسایدسنتاز (Nos) از L-Arginine تولید می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تحریکی و مهاری نیتریک‌اکساید بر تعداد سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدهای کبد در موش صحرایی است. ۴۰ سر موش صحرایی ماده بالغ باردار نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۵۰-۲۰۰ گرم به‌طور تصادفی در ۵ گروه قرار گرفتند. به جز گروه کنترل، بقیه گروه‌ها به ترتیب به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان، ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر L-Arginine و ۲۰ میلی‌گرم از پودر L-NAME حل شده در محلول نرمال سالین، نرمال سالین و مخلوط دو ماده L-NAME و L-Arginine را با همان دوزهای مشابه در روزهای سوم، چهارم و پنجم حاملگی به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. سپس موش‌ها را در روز ۱۸ حاملگی، بی‌هوش کرده و کبد حیوانات را خارج و تعداد سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوییدها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و نرم افزار Image j بررسی شد. در این بررسی، تعداد سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدها در گروه‌های L-Arginine و L-NAME، تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل داشت، در حالی که تفاوت معنی‌داری در مقایسه دو متغیر فوق بین گروه L-Arginine + L-NAME و گروه کنترل مشاهده نشد. این مطالعه نشان داد که مصرف ترکیبی از دو ماده L-NAME و L-Arginine می‌تواند اثرات تحریکی و مهاری نیتریک‌اکساید بر تعداد سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدهای کبد را تعدیل کند.

کلمات کلیدی: کبد، سلول کوپفر، سینوزوئید، نیتریک‌اکساید، L-Arginine، L-NAME..

مقدمه

نیتریک‌اکساید (NO)، یک ملکول دو اتمی و چربی دوست با نیمه عمر کوتاه است که به عنوان یک پیامبر داخل سلولی و بین سلولی، در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک بدن از جمله آپوپتوز، انتقال پیام‌های عصبی، تنظیم جریان و فشار خون، رشد سلولی و تنظیم تونوسیته عروق، عملکرد کلیه و مکانیسم دفاعی دخالت دارد (۱، ۲). نیتریک‌اکساید می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان اثر محافظتی در برابر آسیب اکسیداتیو داشته باشد. از طرف دیگر این ماده می‌تواند تشدید کننده‌ی آسیب اکسیداتیو باشد (۳) .نیتریک‌اکساید با

توجه به نوع، سلول سازنده و سلول هدف آن، می‌تواند به‌عنوان یک کاهنده یا یک تشدیدکننده آسیب اکسیداتیو عمل کند (٤). این ماده توسط آنزیم نیتریک‌اکسایدسنتاز (NOS) از پیش‌ساز ال-آرژنین در بسیاری از اندام‌های بدن، تولید می‌شود. برای این عمل، از اکسیژن ملکولی، نیکوتینامید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) و از کوفاکتورهای دیگر استفاده می‌کند (٥). ال-آرژنین یک آمینواسید نیمه ضروری بوده و برای ساخت نیتریک‌اکساید، پلی آمین‌ها به‌عنوان سوبسترا عمل کرده و بر ترشح هورمونی تأثیر می‌گذارند (٦). توانایی سنتز نیتریک‌اکساید از ال-آرژنین به واسطه آنزیم نیتریک‌اکسایدسنتاز به‌وسیله انواع گوناگونی از سلول‌ها، از جمله سلول‌های پارانشیم کبدی (۷، ۸) و سلول‌های کوپفر یعنی ماکروفاژهای ساکن در کبد صورت می‌گیرد (۹). این آنزیم دارای ۳ ایزوفرم اندوتلیال (eNOS)، نورال (nNOS) و القایی (iNOS) است (٥، ۱۰). ایزوفرم eNOS در سلول‌های اندوتلیال عروق و میوسیت‌های قلبی به غشای پلاسمایی بوده و همچنین در گشادی عروق نیز نقش دارد (۱۱). nNOS موجود در سلول‌های عصبی و گلیال در تنظیم جریان خون عروق مغزی، حافظه و یادگیری دخالت دارد (۱۲، ۱۳). ایزوفرم iNOS در ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، عضلات صاف و اندوتلیال عروق کوچک، قلب، کبد و مگاکاریوسیت‌ها وجود دارد (١٤) نیتریک‌اکساید تولید شده توسط eNOS و nNOS در فرآیندهای داخل سلولی و نیتریک‌اکساید تولید شده توسط iNOS در فرآیندهای التهابی درگیر است (١٥). در کبد، eNOS و iNOS نقش اصلی را دارند، در حالی که نقش nNOS به خوبی شناخته نشده است (١٦). آنالوگ ال-آرژنین به دلیل جایگزینی یک یا دو نیتروژن انتهایی گوانیدینو (G یا W)، به‌عنوان مهارکننده نیتریک‌اکسایدسنتاز عمل می‌کند (۱۷). یکی از آنالوگ‌های ال-آرژنین L-NAME است که مهار کننده‌ی نیتریک‌اکسایدسنتاز بوده و باعث کاهش سنتز نیتریک‌اکساید می‌شود (۱۸). کبد یکی از بزرگترین اعضای داخل بدن است که حدود ۲ درصد از کل وزن بدن را به خود اختصاص داده است. سلول‌های اصلی آن، هپاتوسیت‌ها هستند که از لحاظ عملکردی متنوع‌ترین سلول‌های بدن به حساب می‌آیند و در فعالیت‌هایی همچون سنتز پروتیئن‌های پلاسما، گلوکونئوژنز، سم‌زدایی و ذخیره ویتامین‌ها و آهن نقش دارند. در بین صفحات آناستوموزی هپاتوسیت‌های کبد، سینوزوئیدهایی وجود دارد که شاخه‌های محیطی ورید پورت و شریان کبدی به‌داخل آن‌ها می‌ریزند. سینوزوئیدهای آناستوموزی با پوشش نازکی از سلول‌های اندوتلیال منفذدار، یک تیغه پایه ناپیوسته و رشته‌های رتیکولر احاطه شده‌اند. سلول‌های کوپفر از جمله سلول‌هایی هستند که در ساختار دیواره سینوزوئیدها شرکت دارند و ماکروفاژهای ستاره‌ای شکل تخصص‌یافته‌ای هستند که در داخل پوشش سینوزوئیدها قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها اریتروسیت‌های پیر را تشخیص داده و فاگوسیت می‌کنند. این امر سبب رها شدن Heme گلبول‌های قرمز پیر و فرسوده شده و آهن حاصله برای استفاده مجدد یا ذخیره در کمپلکس‌های فریتین نگهداری می‌شود. سلول‌های کوپفر همچنین ارائه کننده آنتی ژن هستند و هرگونه باکتری یا خرده سلول موجود در خون پورتال را از محیط برمی‌دارند (۱۹).

با توجه به تحقیقات محدودی که در زمینه اثرات تحریکی و مهاری نیتریک‌اکساید بر ساختار بافتی کبد انجام شده و از طرفی به‌علت اثرات دوره بارداری بر کبد و سیستم ایمنی از جمله افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون و دخالت کبد در اعمال دفاعی و ایمنی، بر آن شدیم تا با انجام این مطالعه، گامی هرچند کوچک در کشف درمان‌های جدید بیماری‌های کبدی برداشته باشیم.

مواد و روش‌ها

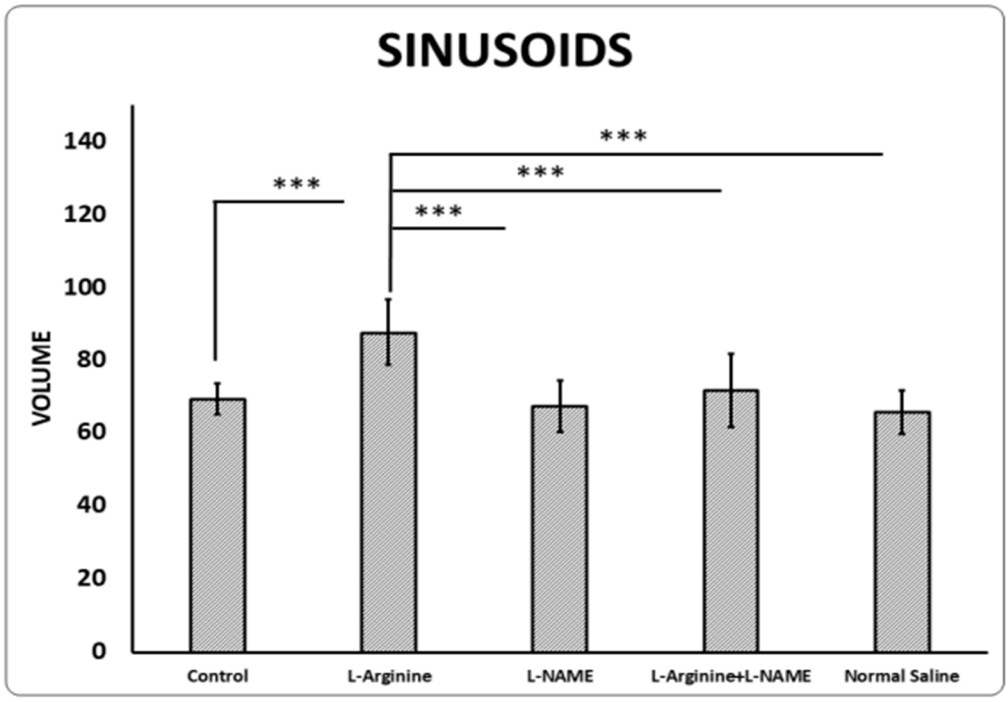
در این مطالعه تجربی از ٤٠ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن متوسط ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم تهیه شده از انستیتوپاستور ایران، استفاده شد. موش‌ها با دسترسی آزاد به غذا و آب، در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، نگهداری شدند (کد اخلاق پایان‌نامه IR.IAU.TMU.REC. 1402.073). پس از اطمینان از انجام جفت‌گیری، روز مشاهده پلاک واژینال روز صفر حاملگی درنظر گرفته شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه کنترل، نرمال سالین، L-Arginine و L-NAME که همان ترکیب NG-Nitroarginine Methyl Ester است و مخلوط دو ماده L-Arginine و L-NAME (تهیه شده از شرکت Sigma آلمان)، تقسیم شدند. به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان، ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر L-Arginine و ۲۰ میلی‌گرم از پودر L-NAME حل شده در محلول نرمال سالین در نظر گرفته شد. سپس در روزهای سوم، چهارم و پنجم حاملگی به جز گروه کنترل، بقیه گروه‌ها به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان، ۲۰۰ میلی‌گرم از پودر L-Arginine، ۲۰ میلی‌گرم پودر L-NAME و مخلوط دو ماده با همان دوزهای مشابه به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. موش‌ها در روز هجدهم حاملگی، بی‌هوش شده و کبد آن‌ها خارج و در محلول فرمالین ده درصد فیکس شد. سپس فرایند پاساژ بافتی را انجام داده، برش‌های سریالی با ضخامت ۵ میکرون تهیه کرده و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H & E). بر طبق پروتکل استاندارد انجام گرفت. برای تعیین حجم سینوزوئیدها از روش کاوالییری استفاده شد که اولین مرحله برای انجام این کار، برش زدن بافت به صورت سریالی می‌باشد. سپس از یک سیستم آزمون نقطه‌ای استفاده شده به صورتی که این شبکه نقاط بر روی مقاطع بافتی قرار گرفته و با شمارش تعداد نقاط، حجم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: $V = \sum p.\ a/p.t$ که در این فرمول $\sum P$ تعداد نقاطی از سیستم آزمون که بر روی بافت قرار می‌گیرند، a/p، مساحت هر نقطه و t فاصله هر مقطع از مقطع بعدی است. برای تعیین تعداد سلول‌های کوپفر هم از نرم افزار Image J استفاده و تعداد سلول‌های کوپفر در واحد سطح شمارش شد.

نتایج

نتایج کمّی: نمودار شکل ۱ مربوط به نتایج کمّی این تجربه است و نشان داد که تعداد سلول‌های کوپفر در گروه ال-آرژنین در مقایسه با گروه کنترل و L-NAME و نرمالین سالین و L-Arginine + L-NAME به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۵$). البته تعداد سلول‌های کوپفر در گروه L-NAME در مقایسه با گروه کنترل و نرمالین سالین به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($p < ۰/۰۵$) و تعداد سلول‌های کوپفر موجود در گروه L-Arginine + L-NAME تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و نرمالین سالین نشان نمی‌دهد ($p > ۰/۰۵$). نمودار شکل ۲ مربوط به نتایج کمّی این تجربه در خصوص حجم سینوزوئیدها است و نشان می‌دهد که حجم سینوزوئیدها در گروه ال-آرژنین در مقایسه با دیگر گروه‌های تجربی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته ($p < ۰/۰۵$)، ولی تفاوت معنی‌داری در گروه‌های دیگر مشاهده نشده است ($p > ۰/۰۵$).

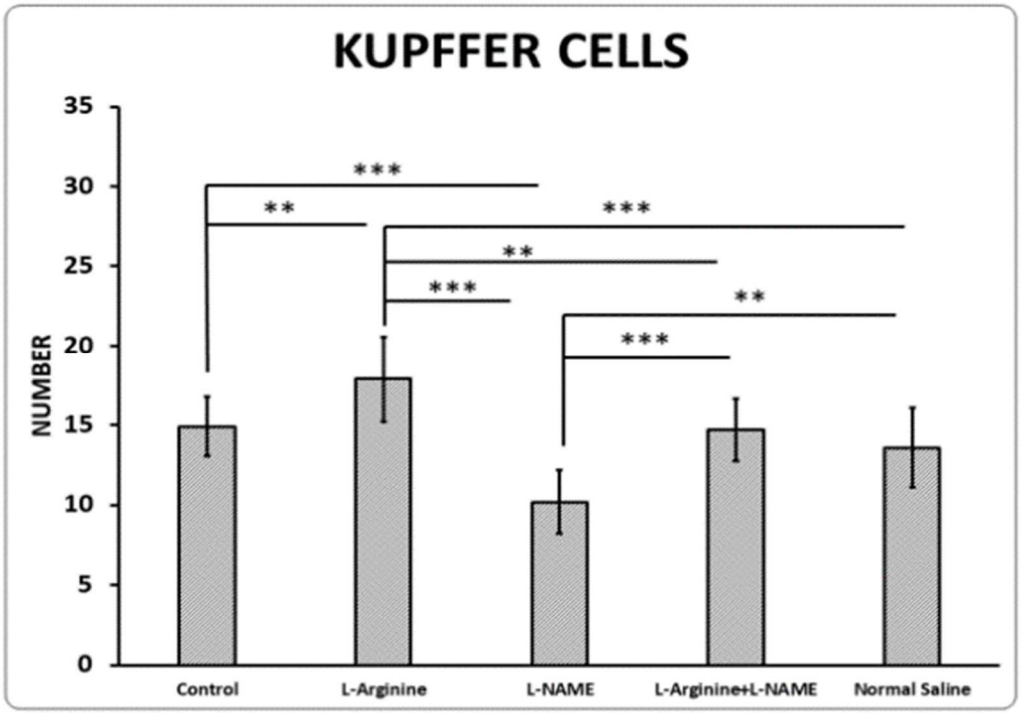
نتایج کیفی: شکل ۳ وضعیت سینوزوئیدها و تراکم سلول‌های کوپفر در حالت طبیعی را نشان می‌دهد. شکل ٤ مربوط به نتایج کیفی حجم سینوزوئیدها و تراکم سلول‌های کوپفر در گروه L-Arginine است و نشان می‌دهد که در این گروه تراکم سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدها افزایش داشته است. شکل ۵ مربوط به نتایج کیفی حجم سینوزوئیدها و تراکم سلول‌های کوپفر در گروه L-NAME است و نشان می‌دهد که در موش‌هایی که تحت تزریق صفاقی L-NAME قرار

گرفته‌اند، تراکم سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدها کاهش پیدا کرده است. شکل ٦ مربوط به نتایج کیفی حجم سینوزوئیدها و تراکم سلول‌های کوپفر در گروه L-NAME + L-Arginine می‌باشد و نشان می‌دهد که در این گروه تراکم سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدها نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد. شکل ۷ مربوط به نتایج کیفی حجم سینوزوئیدها و تراکم سلول‌های کوپفر در گروه نرمالین سالین بوده و نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری در حجم سینوزوئیدها و تراکم سلول‌های کوپفر به‌وجود نیامده است.



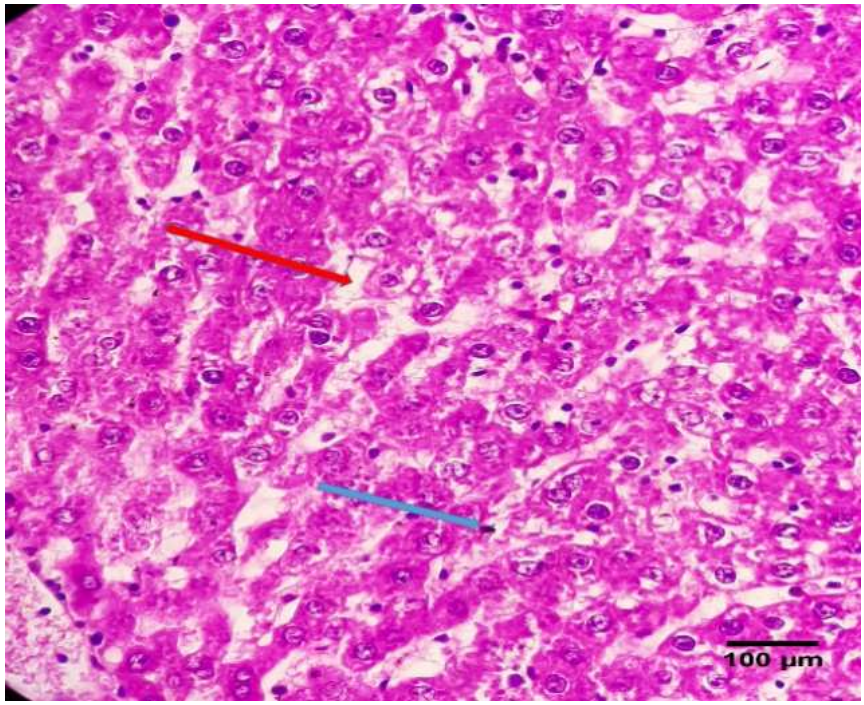
شکل ۱- مقایسه تعداد سلول‌های کوپفر در گروه‌های مورد مطالعه.

Fig. 1. Comparison of the number of Kupffer cells in the studied groups.



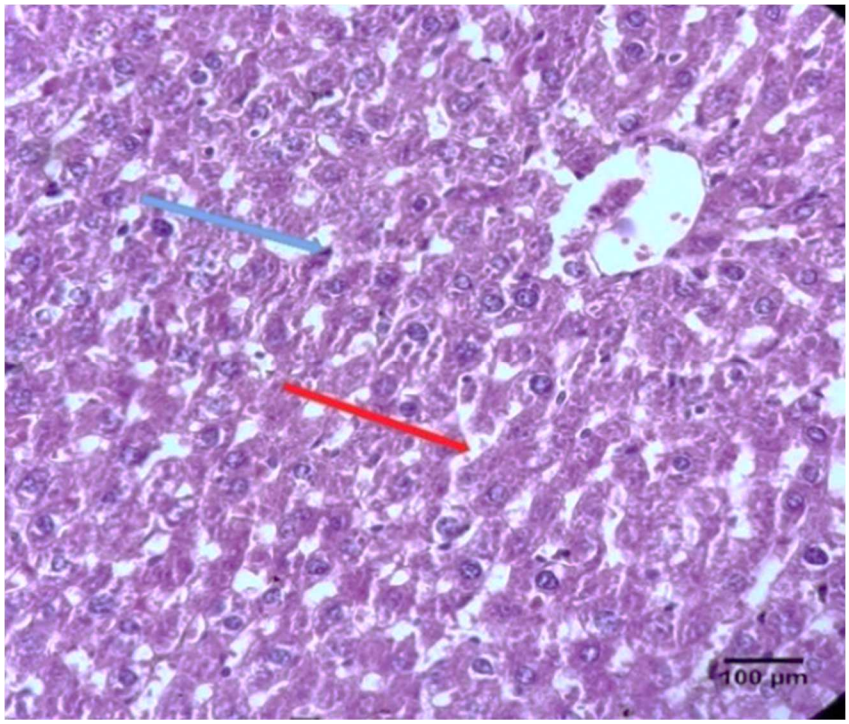
شکل ۲- مقایسه حجم سینوزوئیدهای کبدی در گروه‌های مورد مطالعه.

Fig. 2. Comparison of the volume of hepatic sinusoids in the studied groups.



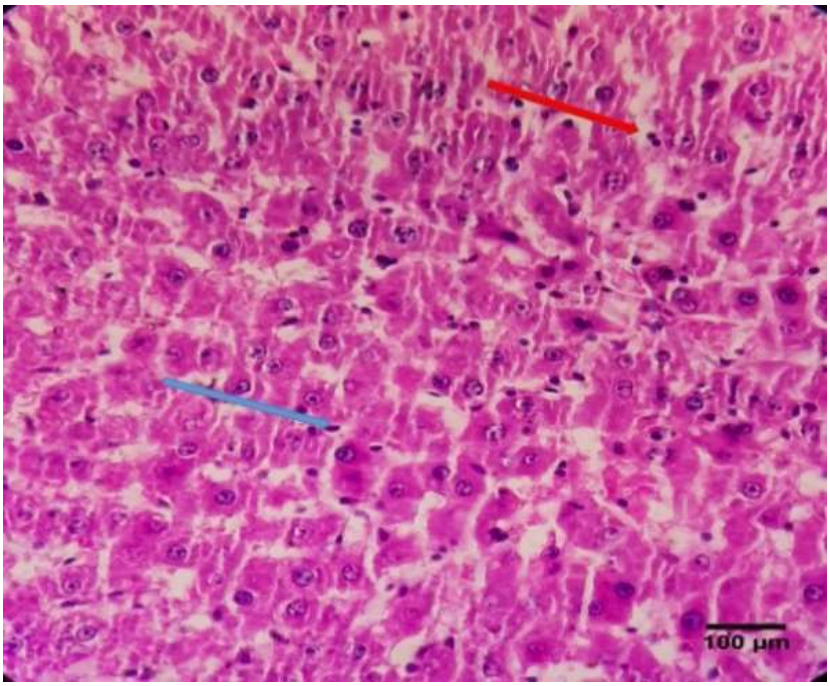
شکل ۳- لام میکروسکوپی کبد گروه کنترل که در آن فلش قرمز، فضای سینوزوئیدی و فلش آبی، سلول کوپفر را نشان می‌دهد(رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی X ٤۰).

Fig. 3. Microscopic slide of the liver of the control group, in which the red arrow indicates the sinusoidal space and the blue arrow indicates the Kupffer cell (H-E, X40).



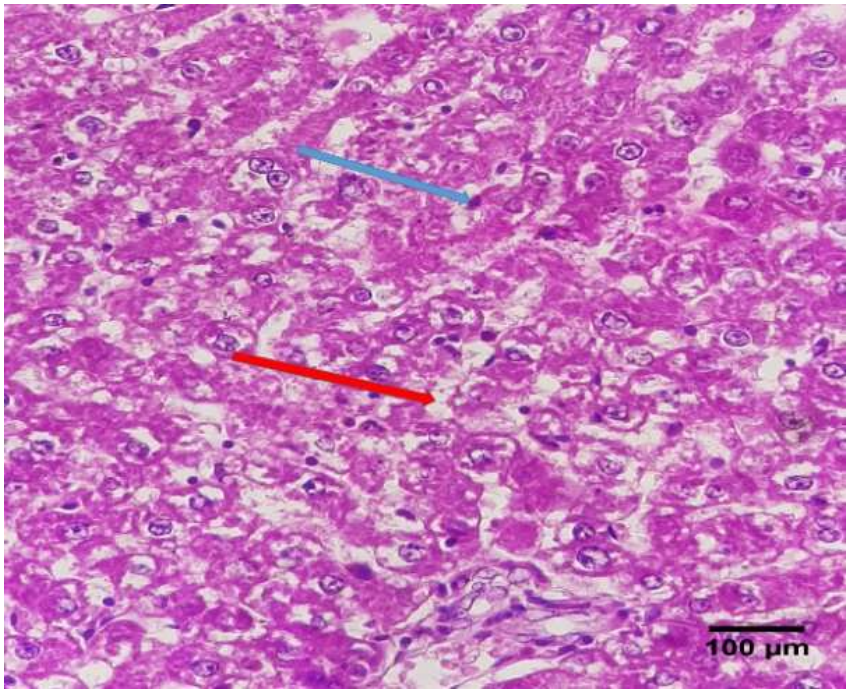
شکل ٤- لام میکروسکوپی کبد گروه L-Arginine فلش قرمز، فضای سینوزوئیدی و فلش آبی، سلول کوپفر را نشان می‌دهد(رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ٤۰X).

Fig. 4. Microscopic slide of the liver of the L-Arginine group. The red arrow indicates the sinusoidal space and the blue arrow indicates the Kupffer cell (H-E, X40).



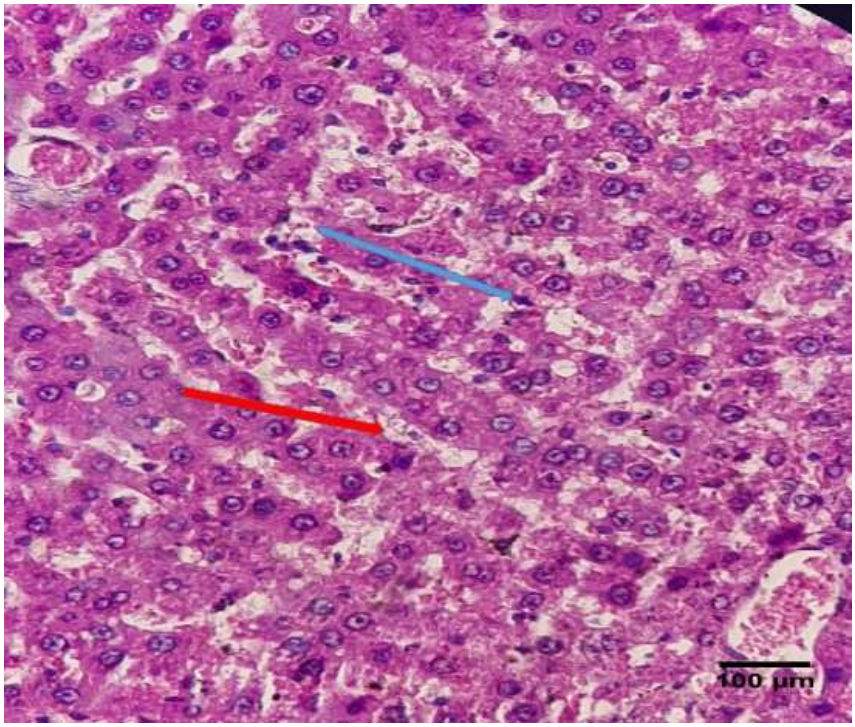
شکل ٥- لام میکروسکوپی کبد گروه L-NAME فلش قرمز، فضای سینوزوئیدی و فلش آبی، سلول کوپفر را نشان می‌دهد(رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ٤۰X).

Fig. 3. Microscopic slide of the liver of the L-NAME group. The red arrow indicates the sinusoidal space and the blue arrow indicates the Kupffer cell (H-E, X40).



شکل ٦- لام میکروسکوپی بافت کبدی گروه L-NAME + L-Arginine فلش قرمز، فضای سینوزوئیدی و فلش آبی، سلول کوپفر را نشان می‌دهد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی X ٤۰).

Fig. 4. Microscopic slide of liver tissue from the L-NAME + L-Arginine group. Red arrow indicates sinusoidal space and blue arrow indicates Kupffer cell (H-E, X40).



شکل ۷- لام میکروسکوپی بافت کبدی گروه نرمال سالین فلش قرمز، فضای سینوزوئیدی و فلش آبی، سلول کوپفر را نشان می‌دهد(رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی X٤۰).

Fig. 5. Microscopic slide of liver tissue from the normal saline group. The red arrow shows the sinusoidal space and the blue arrow shows the Kupffer cell (H-E, X40).

بحث

در این مطالعه تأثیر ال-آرژنین و L-NAME و سیستم نیتریک‌اکساید بر روی تعداد سلول‌های کوپفر و همچنین حجم سینوزوئیدها، بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان داد، در گروه ال-آرژنین، افزایش تعداد سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدها مشاهده شد که می‌تواند نشان دهنده آسیب اکسیداتیو نیتریک‌اکساید بر بافت کبد باشد، ولی مهار سنتز نیتریک‌اکساید توسط L-NAME، تفاوت معنی‌داری در حجم سینوزوئیدها نشان نداد. از طرفی تفاوت معنی‌داری بین حجم سینوزوئیدهای گروه L-Arginine + LNAME و کنترل دیده نشد که می‌تواند حاصل از اثر اکسیداتیو نیتریک‌اکساید توسط L-NAME و تعدیل اثرات L-Arginine باشد. در این آزمایش، از ال-آرژنین به عنوان پیش ساز ساخت نیتریک‌اکساید استفاده شد و در پی مصرف آن، کاهش حجم سیتوپلاسم، افزایش فصاهای سینوزوئیدی، افزایش سلول‌های کوپفر و آسیب اکسیداتیو در کبد مشاهده شد. همچنین مهار نبتریک اکساید به‌وسیله L-NAME، نتایجی متصاد با افزایش نیتریک‌اکساید نشان داد که نشان دهنده‌ی نقش محافظتی آن بر سلول‌های کبدی است. در آزمایشات متعددی، نقش مواد مختلف بر روی سمیّت اکسیداتیو کبد و همچنین اثر نیتریک‌اکساید بر روی آن بررسی شده است. در مطالعه بردبار و همکاران نیز، بیسفنول-A (Bisphenol A) باعث القای آسیب اکسیداتیو در کبد شد که مصرف رزوراترول، اثر محافظتی در برابر سلول‌های کبدی از خود نشان داد (۲۰). در پژوهش گودرزی و همکاران، نشان داده شد که عوامل آنتی اکسیدان گیاهی می‌توانند باعث کاهش اندازه سینوزوئیدها شوند. نتیجه آزمایشات گودرزی مطابق با نتیجه استفاده از مهارکننده‌ی نیتریک‌اکساید سنتاز توسط L-NAME در این پژوهش است (۲۱). Cogger و همکاران در مطالعه اثرات استرس اکسیداتیو بر مورفولوژی کبد سالم را بررسی و مشاهده کردند که استرس اکسیداتیو به سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی کبد آسیب می‌رساند. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که پیش‌ساز نیتریک‌اکساید می‌تواند باعث افزایش حجم سینوزوئیدها و آسیب اکسیداتیو شود (۲۲) در پژوهش حاضر ثابت شد که مصرف L-NAME همراه با L-Arginine، باعث تقریباً ثابت ماندن حجم سنوزوئید نسبت به گروه کنترل می‌شود که نشان دهنده‌ی اثر مهاری L-NAME بر روی سمّیت نیتریک‌اکساید است. این یافته با نتایج پژوهشگران دیگر در سال ۲۰۱۷ و همچنین پژوهش Sikiric و همکاران، هم‌پوشانی دارد (۲۳، ۲٤). در پژوهش Rochette، مولکول نیتریک‌اکساید به‌عنوان یک شمشیر دولبه معرفی شده است که در مقادیر کافی نقش مهمی را در فعالیت‌های فیزیولوژیک بدن ایفا می‌کند، ولی مقدار کم آن و یا زیاد آن می‌تواند باعث ایجاد مشکلاتی از جمله آسیب بافتی و التهاب شود. همچنین روچت استفاده از مهارکننده‌ی تولید نیتریک‌اکساید را به عنوان درمان احتمالی برای بیماری‌های حاصل از افزایش مقدار نیتریک‌اکساید معرفی می‌کند (۲۵). یافته‌های پژوهش حاضر با این مقاله مطابقت دارد و برای مقابله با اثرات اکسیداتیو نیتریک‌اکساید، از مهارکننده سنتز آن (L-NAME) استفاده شد. در مطالعات زیادی نقش نیتریک‌اکساید را بیشتر مضر و آسیب‌رساننده می‌دانند تا سودمند. در مقاله Isobe، ذکر شده است که در ایسکمی-پرفیوژن مجدد کبدی، بیان نیتریک‌اکساید القایی در سلول‌های کوپفر و نوتروفیل‌ها افزایش پیدا می‌کبد، ولی در میزان نیتریک‌اکساید اندوتلیالی تغییر ایجاد نمی‌شود (۲٦). فقدان نیتریک‌اکسایدسنتاز القایی (iNos)، باعث محافظت از کبد در برابر آسیب می‌شود (۲۷). در این پژوهش نیز تزریق داخل صفاقی ال-آرژنین باعث افزایش آسیب کبدی و در نتیجه افزایش حجم

سینوزوئیدها و سلول‌های کوپفر می‌شود که می‌تواند ناشی از افزایش نیتریک‌اکسایدسنتاز القایی باشد. در همین راستا، در پژوهش ابومارا و همکاران ذکر شده است که ایزوفرم اندوتلیال نیتریک‌اکسایدسنتاز (eNos)، نقش محافظتی در برابر بیماری ایسکمی-پرفیوژن مجدد کبدی دارد در حالی که ایزوفرم القایی آن (iNos) می‌تواند با توجه به مدت زمان ایسکمی-پرفیوژن، هر دو نقش محافظتی و یا آسیب رساننده را داشته باشد (۲۸) سایر پژوهشگران نیز به اثر محافظتی eNOS برخلاف iNOS در بیماری‌ها و ایسکمی کبدی، پی برده‌اند (۲۹) در این پژوهش برخلاف پژوهش ژنگ که به نتایج امیدوار کننده درباره اثر محافظتی نیتریک‌اکساید تولید شده در مسیر eNOS رسیده بودند، یافته‌ای به نفع اثر دوگانه از نیتریک‌اکساید مشاهده نشد (۳۰) این اختلاف می‌تواند به دلیل اثرات بارداری بر تقویت سیستم ایمنی باشد که باعث شده غالب NO تولید شده در پژوهش اخیر، از مسیر iNOS که دارای اثرات سمی و اکسیداتیو است باشد. در پژوهش‌های متعددی، هر دو نقش تخریبی و محافظتی را برای مولکول نیتریک‌اکساید در ایسکمی-پرفیوژن مجدد کبدی در نظر گرفته‌اند. در سال ۱۹۹۹، با مهار کردن نیتریک‌اکسایدسنتاز در موش، تخریب سلول‌های کبدی را مشاهده کردند (۳۱). در این آزمایش نیز از L-NAME برای مهار نیتریک‌اکسایدسنتاز استفاده شد که نتیجه حاصل از استفاده‌ی آن در تضاد با پژوهش‌های ذکر شده است. در پژوهش دیگری ذکر شده است که اثر مهاری L-NAME باعث بهبود ایسکمی-پرفیوژن مجدد کبدی(Hepatic ischemia-reperfusion) می‌شود (۳۲) در مقالات دیگر، کاهش تخریب کبدی در بیماری ایسکمی-پرفیوژن مجدد کبدی، پس از پیش درمان با ال-آرژنین (پیش ساز نیتریک‌اکساید)، مشاهده شد (۳۳، ۳٤). همچنین Eleftherios نیز در پژوهش خود نقش محافظتی برای ال-آرژنین در برابر بیماری ایسکمی-پرفیوژن مجدد روده‌ای (Intestinal Ischemia-reperfusion) بیان کرده است و نقش L-NAME را عکس آن و دارای نقش تخریبی می‌داند. این یافته‌ها با نتایج این پژوهش، مطابقت ندارد که می‌تواند به‌دلیل منشأهای متفاوت ساخت نیتریک‌اکساید در این دو پژوهش باشد (۳۵) چینگ در سال ۲۰۰۱ نیز نقش نیتریک‌اکساید القایی بر روی ایسکمی-پرفیوژن مجدد کبدی را بررسی کرده است. وی سلول‌های کوپفر را منبع اصلی القاء تولید نیتریک‌اکساید القایی دانسته و بیان می‌کند که نیتریک‌اکساید القایی باعث کاهش آسیب کبدی شده و نقش محافظتی دارد. در پژوهش حاضر نیتریک‌اکساید القایی دارای نقش تخریبی بر روی سلول‌های کبدی داشت و با نتایج چینگ در تضاد بود (۳٦) در حال حاضر به‌دلیل اهمیت نیتریک‌اکساید و نقش آن به عنوان یک مولکول پیامبر در بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژی مانند التهاب، ایمنی، ترشح هورمون، تجمع پلاکت‌ها و غیره، پژوهش های متعددی درارتباط با اثرات نیتریک‌اکساید و ال-آرژنین(پیش ساز نیتریک‌اکساید) بر روی اندام‌های مختلف بدن و بیماری‌های ناشی از اختلال در عملکرد آن وجود دارند (۳۷، ۳۸، ۳۹) پژوهش کیبه در سال ۱۹۹۹، نقش نیتریک‌اکسایدسنتاز القایی را بر روی سیستم قلبی عروقی مثبت و محافظتی معرفی کرده است (٤۰) همچنین در مقاله‌ای دیگر نیز در سال ۱۹۹۸، بیان می‌شود که نیتریک‌اکساید در جلوگیری از آرترواسکلروز مؤثر است (٤۱) در حالی که در پژوهش حاضر نقش نیتریک‌اکسایدسنتاز القایی بر روی سلول‌های کبدی، مضر و آسیب رساننده شناخته شد. در پژوهش علی آذرگون جهرمی در سال ۲۰۲۳، نقش نیتریک‌اکساید بر روی بیماری آلزایمر بررسی شد. در این مقاله برای نیتریک‌اکساید دو نقش مثبت و منفی در بیماری آلزایمر درنظر گرفته شده است. از طرفی

نیتریک‌اکساید با القای انعطاف‌پذیری عصبی، محافظت عصبی و میلینه شدن نورون‌ها، تأثیر مثبت بر روی نورون‌ها می‌گذارند و از طرف دیگر دارای خاصیت سایتولیتیک برای کاهش التهاب است (٤٢) در این پژوهش نیز دو نقش تخریبی و محافظتی برای نیتریک‌اکساید بر روی کبد درنظر گرفته شده است. پژوهشی دیگر در سال ۲۰۲۱، نقش نیتریک‌اکساید را بر روی بیماری‌های پرده جنب بررسی کرده است. در این مقاله نیز ذکر شده است که نیتریک‌اکساید دارای دو نقش مثبت و منفی می‌باشد. نیتریک‌اکساید در پاسخ ایمنی در برابر تکثیر پاتوژن در داخل سلول و در کاهش مهاجرت نوتروفیل نقش مثبت دارد، ولی وقتی مقدار آن افزایش می‌یابد، باعث القای اثرات پیش‌التهابی سایتوتوکسیک و جهش‌زا می‌شود (٤٣) در این پژوهش نیز دو نقش تخریبی و محافظتی برای نیتریک‌اکساید بر روی کبد درنظر گرفته شده است. در بعضی از مقالات مشابه پژوهش حاضر از ال-آرژنین در تولید نیتریک‌اکساید و درمان برخی بیماری‌ها استفاده شده است. نتایج پژوهشی در سال ۲۰۱۹ نشان داد که ال-آرژنین به دلیل خاصیت وازودیلاتوری نیتریک‌اکساید، در درمان و کاهش افزایش فشار ناشی از مصرف نمک نقش دارد. همچنین در این مقاله، دلیل بیماری‌های اندوتلیال عروق را بیشتر اختلال در ترشح واسطه محافظتی اندوتلیالی یا همان نیتریک‌اکساید می‌داند (٤٤) با توجه به یافته‌های این مطالعه پیش‌سازهای نیتریک‌اکساید می‌توانند باعث افزایش تعداد سلول‌های کوپفر در کبد شوند. تعداد سلول‌های کوپفر در موش‌هایی که تحت تزریق داخل صفاقی L-Arginine قرار گرفته بودند به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا کرد (p = ۰/۰۰٤) در لام‌های تهیه شده از بافت کبدی موش‌های بارداری که تحت تزریق داخل صفاقی L-NAME قرار گرفته بودند تعداد سلول‌های کوپفر نسبت به کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود (p = ۰/۰۰٤). این در حالی است که ارتباط معنی‌داری بین تعداد سلول‌های کوپفر کبدی در گروه L-Arginine + LNAME و گروه کنترل مشاهده نشد (p = ۰/۸٤۱). همچنین در این مطالعه نشان داده شد که پیش‌سازهای نیتریک‌اکساید می‌توانند باعث افزایش حجم سینوزوئیدهای کبد شوند. حجم سینوزوئیدهای کبدی در موش‌هایی که تحت تزریق داخل صفاقی L-Arginine قرار گرفته بودند در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده بود (p = ۰/۰۰۰) به‌نظر می‌رسد این تغییرات ناشی از اثر اکسیداتیو نیتریک‌اکساید بر سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدهای کبد در موش صحرایی باردار باشد. از طرف دیگر حجم سینوزوئیدها در لام تهیه شده از بافت کبدی موش‌های صحرایی بارداری که تحت تزریق داخل صفاقی L-NAME قرار گرفته بودند نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p = ۰/٥٤٦). همچنین ارتباط معنی‌داری بین حجم سینوزوئیدهای کبدی گروه L-Arginine + L-NAME و گروه کنترل مشاهده نشد (p = ۰/٤٦۹) که این امر می‌تواند به‌دلیل خنثی شدن اثر L-Arginine توسط L-NAME باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه فوق نشان داد که احتمالاً مصرف ترکیبی از دو ماده L-NAME و L-Arginine می‌تواند اثرات تحریکی و مهاری نیتریک‌اکساید بر تعداد سلول‌های کوپفر و حجم سینوزوئیدهای کبد را تعدیل کند.

منابع

1. Kawahara K, Hachiro T, Yokokawa T, Nakajima T, Yamauchi Y, Nakayama Y. Ischemia/reperfusion-induced death of cardiac myocytes: possible involvement of nitric oxide in the coordination of ATP supply and demand during ischemia. J Mol Cell Cardiol. 2006;40(1):35-46.

2. Pfeiffer S, Leopold E, Schmidt K, Brunner F, Mayer B. Inhibition of nitric oxide synthesis by NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME): requirement for bioactivation to the free acid, NG-nitro-L-arginine. Br J Pharmacol. 1996;118(6), 1433-1440.

3. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? J Clin Invest. 2003;111(2):163-169.

4. Boje KM. Nitric oxide neurotoxicity in neurodegenerative diseases. Front Biosci, 2004;(9):763-776.

5. Mondillo C, Pagotto R. M, Piotrkowski B, Reche CG, Patrignani ZJ, Cymeryng CB, Pignataro OP. Involvement of nitric oxide synthase in the mechanism of histamine-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis via histamine receptor subtypes in Sprague-Dawley rats. Biol Reprod. 2009;80(1):144-152.

6. Reyes AA, Karl IE, Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease. Am J Physiol. 1994;267(3 Pt 2):F331-346.

7. Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, Stadler J, Simmons RL, Murray SA. Inducible cytosolic enzyme activity for the production of nitrogen oxides from L-Arginine in hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1990;168(3):1034-1040.

8. Knowles RG, Merrett M, Salter M, Moncada S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. Biochem. J. 1990;270(3):833-838.

9. Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK, Williams DL, Simmons RL. Kupffer cell: hepatocyte cocultures release nitric oxide in response to bacterial endotoxin. J Surg Res. 1990;48(4):349-353.

10. Guix FX, Uribesalgo I, Coma M, Muñoz FJ. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. Prog Neurobiol. 2005;76(2):126-152.

11. Barrett KE, Barman SM, Brooks HL, Yuan JX, In Ganong's Review of Medical Physiology, 26e. McGraw-Hill, 2019;1335-1355.

12. Chou TC, Yen MH, Li, CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. Hypertension. 1998;31(2):643-648.

13. Harlan RE, Webber DS, Garcia MM. Involvement of nitric oxide in morphine-induced c-Fos expression in the rat striatum. Brain Res Bull. 2001;54(2):207-212.

14. Joseph Loscalzo LJ. Harrison's Internal Medicine, 21th Edition, 2022;Vol 1:2250-2251 & Vol 2:2679-2375.

15. Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. Pharmacol Ther. 2005;106(2):47-162.

16. Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases. Trends Pharmacol Sci. 2015; 36(8):524-536.

17. Southan GJ, Szabó C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. Biochem Pharmacol. 1996;51(4):383-394.

18. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem Pharmacol. 1989;38(11):1709-1715.

19. Mescher A, L. Editor. In Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 17th Edition, 2024:339-340.

20. Bordbar H, Soleymani F, Nadimi E, Yahyavi SS, Fazelian-Dehkordi K. A Quantitative Study on the Protective Effects of Resveratrol against Bisphenol A-induced Hepatotoxicity in Rats: A Stereological Study. Iran J Med Sci. 2021;46(3):218-227 [In Persian].

21. Goodarzi N, Zangeneh M. M, Zangeneh A, Najafi F, Tahvilian R. Protective effects of ethanolic extract of *Allium saralicum*

R.M. Fritsch on CCl4-induced hepatotoxicity in mice [Applicable]. J Rafsanjan Uni Med Sci. 2017;16(3):227-238 [In Persian].

22. Cogger VC, Muller M, Fraser R, McLean AJ, Khan J, Le Couteur DG. The effects of oxidative stress on the liver sieve. J Hepatol. 2004;41(3):370-376.

23. Abdel-Salam OME, Youness ER, Mohammed NA, Yassen NN, Khadrawy YA, El-Toukhy SE, Sleem AA. Nitric oxide synthase inhibitors protect against brain and liver damage caused by acute malathion intoxication. Asian Pac J Trop Med. 2017;10(8):773-786.

24. Sikiric P, Seiwerth S, Grabarevic Z, Rucman R, Petek M, Jagic V. The influence of a novel pentadecapeptide, BPC 157, on N(G)-nitro-L-arginine methylester and L-arginine effects on stomach mucosa integrity and blood pressure. Eur J Pharmacol. 1997;332(1):23-33.

25. Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guilland J. C, Lorgis L, Cottin Y, Vergely C. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? Pharmacol Ther. 2013;140(3):239-257.

26. Isobe M, Katsuramaki T, Hirata K, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T. Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. Transplantation. 1999;68(6):803-813.

27. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function. Biochemistry (Mosc). 1998;63(7):766-781.

28. Abu-Amara M, Yang SY, Seifalian A, Davidson B, Fuller B. The nitric oxide pathway-evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury .Liver Int. 2012;32(4):531-543.

29. Taha MO, Caricati-Neto A, Ferreira RM, Simões Mde J, Monteiro HP, Fagundes DJ. L-arginine in the ischemic phase protects against liver ischemia-reperfusion injury. Acta Cir Bras. 2012; 27(9):616-623.

30. Zhang B, Liu, QH, Zhou CJ, Hu MZ, Qian HX. Protective effect of eNOS overexpression against ischemia/reperfusion injury in small-for-size liver transplantation. Exp Ther Med. 2016;12(5):3181-3188.

31. Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Descamps G, Durand D, Galen FX., Clot JP. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat. Hepatology. 1999;29(3):809-813.

32. Iwasaki J, Afify M, Bleilevens C, Klinge U, Weiskirchen R, Steitz J. The Impact of a Nitric Oxide Synthase Inhibitor (L-NAME) on Ischemia¯Reperfusion Injury of Cholestatic Livers by Pringle Maneuver and Liver Resection after Bile Duct Ligation in Rats. Int J Mol Sci. 2019;20(9):2114.

33. Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N. Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. Transplantation. 1998;66(5):579-585.

34. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin M. B, Ishizaki N, Urakami A. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. J Am Coll Surg. 1999;188(1):43-52.

35. Margaritis EV, Yanni AE, Agrogiannis G, Liarakos N, Pantopoulou A, Vlachos I. Effects of oral administration of (L)-arginine, (L)-NAME and allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Life Sci. 2011;88(23-24):1070-1076.

36. Hsu CM, Wang JS, Liu CH, Chen LW. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. Shock. 2002;17(4):280-285.

37. Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V. Nitric oxide and cancer: a review. World J Surg Oncol. 2013; 11:118.

atherosclerosis. Clin Cardiol. 1998; 21(7):473-476.

42. Azargoonjahromi A. Dual role of nitric oxide in Alzheimer's disease. Nitric Oxide. 2023;134-135:23-37.

43. Kotsiou OS, Gourgoulianis KI, Zarogiannis SG. The role of nitric oxide in pleural disease. Respir Med, 2021; 179:106350.

Arikawe AP, Udenze IC, Olusanya AW, Akinnibosun OA, Dike I, Duru BN. L-arginine supplementation lowers blood pressure, protein excretion and plasma lipid profile in experimental salt-induced hypertension in pregnancy: Relevance to preeclampsia. Pathophysiol. 2019;26(3-4): 191-197.

38. Noori mugahi SMH, SZ, Movaseghi S, Mostafavi Nia A. Investigation of excitatory and inhibitory effects of L-Arginine and L-NAME on thickness of the cortex and medulla of thymus in pregnant rats, Dev Biol. 2021;14(1):49-54 [In Persian].

39. Noori mugahi SMH, Mostafavinia A, Davodi P, Sadr M, Shrefi Z. Stereological Study of Number of Follicles and Mean Follicular Diameters of Spleen Following L-NAME Administration in Pregnant Rat. Medical council of IRI. 2021;38(4):232-235 [In Persian].

40. Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury. Cardiovasc Res. 1999;43(3):650-657.

41. Ikeda U, Maeda Y, Shimada K. Inducible nitric oxide synthase and