زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۸- ۱

مقاله پژوهشی

کاهش التهاب ناشی از ایسکمی مجدد کلیه در موش‌ها توسط آکاستین

الوند الوانی[۱]، عبدالحسین شیروی[۱]، علی قنبری[۲*]، غلامحسن واعظی[۱]، سیروس جلیلی[۲]

۱- گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- مرکز تحقیقات زیست شناسی پزشکی، موسسه فناوری سلامت ، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

*مسئول مکاتبات: aligharak@yahoo.com

DOI: 10.22034/ascij.2022.1938987.1296

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۰۶

چکیده

ایسکمی/خونرسانی مجدد به دلایل زیادی رخ می دهد که مهمترین آنها بستن عروق کلیه در حین پیوند کلیه است. التهاب یکی از مهمترین مکانیسم‌هایی است که در خلال ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیه رخ می‌دهد. ماده آکاستین یک فلاونوئید طبیعی با خواص درمانی فراوان است. در این مطالعه اثر آکاستین بر التهاب ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد کلیه در موش سوری بررسی شد. ۸٤ سر موش نر نژاد balb/c به طور تصادفی به ۱۲ گروه هفت‌تایی تقسیم شدند. گروه‌های شامل کنترل، شم، ایسکمی، کنترل آکاستین، شم آکاستین و ایسکمی/آکاستین بودند. ایسکمی با بستن شریان کلیوی چپ به مدت ٦۰ دقیقه انجام گرفت گروه‌های آکاستین، این ماده را در دوزهای ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. از نمونه‌هابی بافت کلیه برای سنجش ستوکائین‌ها شامل فاکتور نکروز کننده آلف، اینترلوکین یک بتا و تول لایک رسپتور ٤ و همچنین میلوپروکسیداز استفاده شد. میزان یون‌های اصلی از سرم تهیه شده از خون قلبی موش‌ها ارزیابی شدند. مقادیر سیتوکائین‌های التهابی در گروه ایسکمی/خونرسانی مجدد افزایش معنی داری یافته بود ($p < ۰/۰۱$)، در حالیکه در گروه‌هایی دریافت کننده آکاستین، این متغیرها تغییر معنی داری نشان نداد. مقدار میلوپروکسیداز در گروهای ایسکمی/خونرسانی مجدد افزایش معنی داری یافته بود ($p < ۰/۰۱$). در حالیکه در گروه‌هایی دریافت کننده آکاستین، این متغیرها تغییر معنی‌داری نشان نداد. در میان یونها فقط یون منیزیوم در گروه ایسکم/خونرسانی کاهش یافته بود ($p < ۰/۰۱$). همچنین در مورد میزان یون‌ها در گروه‌های آکاستین و کنترل، تفاوت معنی‌داری دیده نشد. ایسکمی/خونرسانی مجدد در مدت ٦۰ دقیقه موجب راه اندازی آبشار التهاب می‌شود و همچنین با صدمه به بافت کلیه، عملکرد این ارگان را مختل می‌کند. آکاستین بواسطه خاصیت ضدالتهابی خود موجب می‌شود که این صدمات به حالت نرمال نزدیک گردد.

کلمات کلیدی: ایسکمی/خونرسانی مجدد، آکاستین، التهاب، کلیه.

مقدمه

خونریزی مجدد ایسکمی کلیه (I/R) که در حین عمل جراحی پیوند کلیه رخ می‌دهد با کاهش سطح اکسیژن و مواد مغذی در کلیه خود را نشان می‌دهد. I/R همراه با شرایط بی هوازی در کلیه‌ها در نتیجه کاهش سطح PHو ATP درون سلولی همزمان با افزایش عوامل اکسیداتیو همراه است (۱۸). آسیب حاد کلیه (AKI) ممکن است پس از I/R در نتیجه راه اندازی آبشار التهابی سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و فعال‌سازی لکوسیت‌ها پیوند کلیه ایجاد شود (۱٤). اگرچه بسیاری از معیارهای تشخیصی قابل اعتماد یا

استراتژی‌های مدیریت توسعه یافته اند، اما القایAKI پس از عمل جراحی پیوند به عنوان یک درگیری پزشکی باقی مانده است. برای حل این چالش، بهره-گیری از ترکیبات با منشا طبیعی مزایای دارویی قابل توجهی را به دلیل ایمنی، قابلیت دسترسی و مقرون به صرفه بودن آنها ارائه کرده است.

ایسکمی/پرفیوژن مجدد (I/R) و نفروتوکسین ها دلایل اصلی ایجاد التهاب حاد کلیه (AKI) هستند (۱۴، ۸). آسیب حاد کلیه، که قبلا به عنوان نارسایی حاد کلیوی نامیده می‌شد، یک اختلال بالینی پیچیده است و همچنان با نتایج ضعیف همراه است. این بیماری اغلب در بیماران بستری دیده می‌شود، AKI در ۵ درصد از بیماران بستری رخ می‌دهد و مربوط به ۳۰ تا ۵۰ درصد از پذیرش در بخش مراقبت‌های ویژه است (۱۰).

اخیراً گیرنده‌های Toll-like (TLRs) به عنوان گروه‌هایی دیگر گیرنده‌های افیونی نامگذاری و شناسایی شده‌اند. TLRها پروتئین‌های غشایی هستند که در طول پاسخ‌های ایمنی و کنترل درد با افزایش ترشح اینترلوکین‌ها مانند فاکتور نکروز تومور (TNF) تنظیم می‌شوند. TLRها به طور گسترده‌ای در بدن وجود دارند و می‌توانند در آستروسیت‌ها و میکروگلیا، سلول‌های بنیادی مغز، ماکروفاژها و همچنین کلیه یافت شوند (۲،۱۱).

Acacetin (ACA) به عنوان یک ترکیب فلاونوئید طبیعی مشتق شده از گیاه، دارای خواص دارویی بسیاری است مانند آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد فیبریلاسیون، مسکن، ضد پراکسیداسیون و ضدآروماتاز (۷، ۱۵) به در مورد ایسکمی/ خونرسانی مجدد، مطالعات نشان‌دهنده اثر شفابخش ACAاست. HA و همکارانش اشاره کردند که التهاب عصبی در سلول‌های BV -2 تحریک شده با لیپوپلی ساکارید و در موش‌های نر توسط Aca کاهش می یابد. همچنین، یانگ و همکارانش مزایای ACA را در عضله قلبی ایسکمی کشت داده شده (ex vivo) ارائه کردند (۲۰، ٤). قبلاً نشان دادیم که ACA با خواص آنتی‌اکسیدانی خود می‌تواند آپوپتوز را در کلیه ناشی از I/R موش کاهش دهد (١٦). در ادامه، مطالعه حاضر برای بررسی پارامترهای مربوط به التهاب در کلیه‌های ناشی از I/R و نشان دادن تأثیر ACA بر این پارامترها طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات: ۸٤ سر موش نر Balb/C به عنوان مدل حیوانی رایج ISC/Rep کلیه (با سن ۱۲-۱٤ هفته و ۲ ± ۳۰ گرم از موسسه پاستور (ایران، تهران) خریداری شد. حیوانات به حیوان‌خانه‌ی دانشکده پزشکی در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه منتقل شدند. حیوانات در دمای ۲۲ ± ۲ درجه سانتیگراد، ۱۲ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی به آب و غذا نگهداری می-شدند. در تمام مراحل جراحی، درجه حرارت بدن ۳۷ درجه سانتیگراد تنظیم شد، مسکن بوپرنورفین هیدروکلراید (۰/۰٦ میلی‌گرم یر کیلوگرم به صورت زیرجلدی تجویز شد و پماد چشم مالیده شد (٥،٦). تحقیقات بر اساس اصول اخلاقی و انسانی تحقیقات تأیید شد و توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تأیید شد (شماره اخلاق: IR.KUMS.REC. 1396.124)

طراحی آزمایشی و روش جراحی: پس از یک هفته سازگاری با خانه حیوانات، موش‌ها به طور تصادفی به ۱۲ گروه (هر کدام ۷ نفر) تقسیم شدند. چهار گروه کنترل موش ۰/۱ درصد DMSO یا ACA دوزهای ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم دریافت کردند. در این گروه‌های از روش لاپاروتومی استفاده شد. ٦۰ دقیقه بعد از عمل، دیواره‌های شکم توسط نخ بخیه قابل جذب بخیه زده شد. یک روز پس از جراحی، ۰/۱

درصد DMSO یا دوزهای ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ACA تجویز شد.

در گروه‌های آزمایشی، بستن یک طرفه شریان‌های کلیه سمت چپ به مدت ٦٠ دقیقه انجام شد که پس از آن مجدداً پرفیوژن (۵،٦،۱۹) انجام می‌شود. زمان ٦٠ دقیقه برای تضمین آسیب کبدی همانطور که قبلاً ذکر شد انتخاب شد (۱۹). سرانجام ، یک روز پس از عمل، موش‌ها DMSO یا) ACA دوزهای ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) دریافت کردند. برای القای بیهوشی در موش‌ها، از تزریق داخل صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) استفاده شد. همه درمان‌ها در ساعت ۱۰ صبح به مدت چهار روز مداوم انجام شد. همه گروه‌هایی آزمایش و کنترل با دوزهای مختلف ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ACA و DMSO تحت درمان قرار گرفتند. ٢٤ ساعت پس از آخرین درمان ، موش ها در ساعت ۱۰ صبح با دررفتگی گردنی قربانی شدند. نمونه خون با قرار دادن سرنگ در بطن چپ قلب به دست آمد. همچنین از کلیه مقداری بافت جدا شد. نمونه‌های خون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سرم‌های جدا شده در فریزر انکوبه شدند

سنجش ELISA: برای ارزیابی سایتوکاین‌ها در بافت کلیه حیوانات با روش) ELISA روش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم)، پروتئین‌های کل ۵۰ میلی‌گرم کلیه راست، به ترتیب با استفاده از RIPA بافر لیز (سنجش رادیو ایمونو پرسیپیتا؛ Abcam، کمبریج، انگلستان) استخراج شد. پس از سانتریفیوژ بافتها در دمای ۱۵۰۰۰ گرم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد، رقت‌های ۱:۲۰ مایع رویی بافت‌های هموژن به ریز صفحه‌های ۹٦ چاهی که با آنتی‌بادی-های مخصوص واکنش آنزیم سوبسترا برای موش صحرایی پوشانده شده بود، اضافه شد. در حالی که محلول‌های استاندارد رقیق شده برای ترسیم منحنی-های استاندارد استفاده شد. سپس، مقادیر – TNF-α (Abcam، کمبریج، انگلستان) IL-1β (اینترلوکین یک بتا)؛ (Abcam، کمبریج، انگلستان)، TLR-4 MyBioSource، کالیفرنیا، ایالات متحده) پروتئین‌ها در بخش‌های رویی با کیت ELISA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به طور خلاصه میزان جذب در نمونه و استانداردها ، به ترتیب، به صورت سه برابر در ٤٥٠ ± ۱۰ نانومتر با طیف‌سنجی انتشار نوری پلاسما همراه PerkinElmer، مدل ۷۳۰۰، ایالات متحده) اندازه‌گیری شد و مقایسه بین این میزان نمونه‌ها و استانداردها انجام شد. برای محاسبه TNF-a، IL-1b و TLR در نمونه‌ها انجام شد.

برآورد پارامترهای سرم مربوط به عملکرد کلیه: برای ارزیابی در مورد پارامترهای پلاسمایی عملکردی کلیه، غلظت‌های +Ca2، +Mg2، +Naو +K با روش الکتروشیمیایی (ECLIA) مورد بررسی قرار گرفت.

برآورد فعالیت میلوپراکسیداز (MPO): فعالیت میلوپراکسیداز به عنوان U/g بافت بیضه برای تعیین میزان لکوسیت‌های چند مورفونوکلئر نفوذی که بر اساس پروتکل قبلاً منتشر شده تصویب شده بود، تنظیم شد. به طور خلاصه، ۲۰ درصد از بافت‌های بیضه راست توسط ۵۰ میلی مولار بافر فسفات پتاسیم (pH = 6) که شامل ۰/۵ درصد هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (HTA) و ۱۰ میلی‌مولار اسید اتیلن دی آمینتراستیک (EDTA) روی یخ همگن شد. پس از یک مرحله انجماد و بکسل و یک فراصوت کوتاه ، بافت های همگن سانتریفیوژ شدند (۱۳۱۰۰ گرم – ۲۰ دقیقه). فعالیت MPO با افزودن ۰/۱٦۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر - o دیانیزیدین دی هیدروکلراید و ۰/۰۰۰۵ درصد هیدروژن پراکسید به مایع رویی در شدت نور در ٤٦٠ نانومتر ارزیابی شد (۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ با استفاده از فرضیه آنووای یک طرفه و سپس آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد و $p < ۰/۰۵$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. متغیرها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین نشان داده شد.

نتایج

اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها: نتایج پروتکل الایزا بر روی بافت کلیه موش در جدول ۱ نشان داده شده است. جدول ۱ افزایش قابل ملاحظه ای در بیان TNF-α، IL-1β و TRL-4 را در موش‌های تحت درمان با I/R در مقایسه با گروه کنترل نشان می دهد. همه گروه‌هایی ACA به ترتیب ($p < ۰/۰۱$). تفاوت معنی‌داری بین کنترل و همه گروه‌هایی ACA و یا در داخل گروه‌هایی ACA وجود نداشت ($p < ۰/۰۵$).

محاسبه فعالیت MPO کلیه: ارزیابی فعالیت MPO کلیه موش‌ها در نمودار ۱ارائه شده است که نشان می-دهد این پارامتردر گروه I/R نسبت به سایر گروه‌های افزایش می یابد ($p < ۰/۰۱$). با این حال، این پارامتر در گروه‌های AC تفاوت معنی داری در مقایسه با کنترل نشان نداد ($p < ۰/۰۵$). فعالیت MPO در گروه I/R در مقایسه با گروه‌هایی ACA به طور قابل توجهی کاهش یافت ($p < ۰/۰۱$)، در حالی که تفاوت معنی داری بین گروه‌هایی ACA وجود نداشت ($p < ۰/۰۵$).

ارزیابی سطح سرمی عملکرد سیستم ادراری: در گروه I/R ، کاهش معنی داری در یون منیزیم نسبت به گروه‌هایی کنترل و ACAs وجود داشت ($p < ۰/۰۱$)، در حالی که یون‌های دیگر سدیم، کلسیم و پتاسیم در گروه سیس پلاتین، تغییرات معنی داری نشان ندادند.

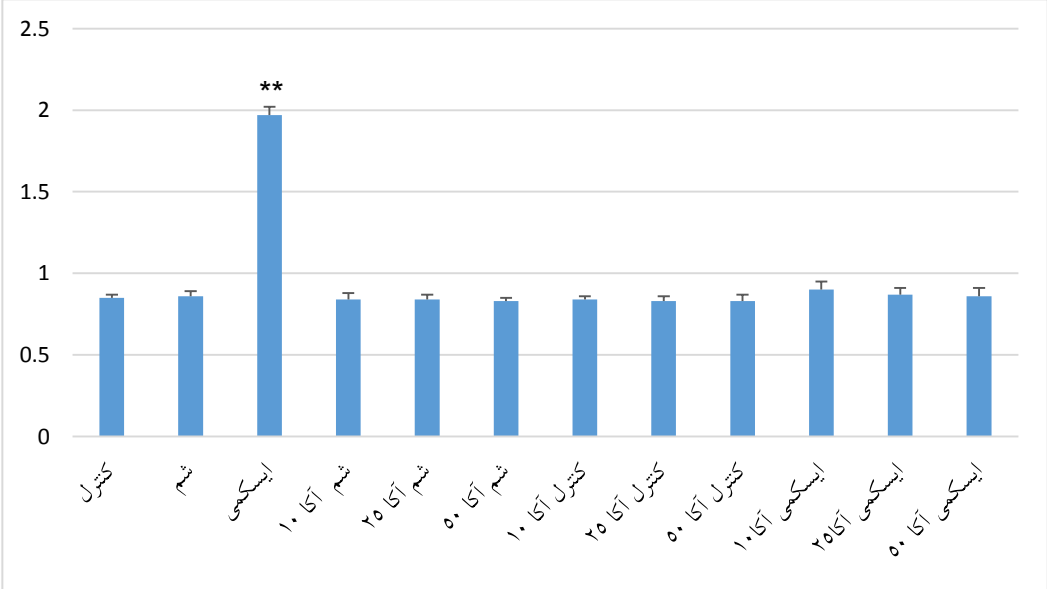
جدول ۱- مقدار بیان پروتئین عوامل التهابی در کلیه موش‌ها با روش الایزا (پیکوگرم/میلی لیتر)

گروه‌ها	TNF-α	IL-1β	TLR-4
کنترل	۸٤±۳/۵	۱٤۸±۳/۵	٦۵±۳/۹
شم	۸۳±٤/۲	۱٤۹±٤/۸	٦٤±٤/۱
ایسکمی	**۲۸۰±٤/٤	**۳۰۵±۳/۵	**۲۱۰±۳/٤
کنترل آکا۲۵	۸۲±۳/۲	۱٤۸±٤/۳	٦٤±٤/۵
کنترل آکا ۲۵	۸۱±٤/۵	۱٤۷±۳/۲	٦۳±٤/۲
کنترل آکا ۵۰	۸۰±۳/۸	۱٤٦±٤/٦	٦۲±۳/۷
شم آکا ۱۰	۸۱±٤/۱	۱٤۷±۳/۸	٦۵±۳/٦
شم آکا ۲۵	۸۱±۳/۸	۱٤٦±٤/۳	٦٤±٤/۲
شم آکا ۵۰	۷۹±٤/۳	۱٤۵±۳/۳	٦۳±٤/٤
ایسکمی آکا ۱۰	۸۹±۳/۳	۱۵۷±٤/۷	۷۳±۳/۸
ایسکمی آکا ۲۵	۸۷±۳/۱	۱۵۳±۳/۹	۷۰±٤/۵
ایسکمی آکا ۵۰	۸۵±۳/۷	۱۵۰±٤/٤	٦۷±۳/۸

مقایسه داده های بین گروهی با $p < ۰/۰۱$:**در مقایسه با گروه های کنترل ، کنترل ACA و گروه ACA شم

جدول۲- تأثیر I/R و ACA بر سطوح سرمی پارامترهای مربوط به عملکرد کلیه موش (مقادیر به میلی مولار در لیتر)

گروه ها	یون منیزیم	یون کلسیم	یون سدیم	یون پتاسیم
کنترل	۲۱/۱±۰۵/۰	۱/۱۵/±۰/۰۳	۱۲۸±۲/۸	۸/۶±۲/۰
شم	۲۲/۱±۰۴/۰	۱/۱۶±۰۴/۰	۱۲۷±۴/۷	۹/۶±۳/۰
ایسکمی	**۰۶۵/۰±۰۲/۰	۲۵/۱±۰۵/۰	۱۳۲±۲/۹	۸/۵±۲/۰
کنترل آکا۲۵	۲/۱±۰۳/۰	۱۳/۱±۰۵/۰	۱۲۶±۷/۳	۷/۶±۴/۰
کنترل آکا ۲۵	۱۹/۱±۰۵/۰	۱۲/۱±۰۳/۰	۱۲۵±۲/۸	۶/۶±۳/۰
کنترل آکا ۵۰	۱۸/۱±۰۴/۰	۱۱/۱±۰۴/۰	۱۲۴±۸/۶	۵/۶±۲/۰
شم آکا ۱۰	۲۲/۱±۰۴/۰	۱۴/۱±۰۵/۰	۱۲۷±۶/۷	۵/۶±۳/۰
شم آکا ۲۵	۱۸/۱±۰۳/۰	۱۳/۱±۰۵/۰	۱۲۴±۳/۷	۴/۶±۵/۰
شم آکا ۵۰	۱۸/۱±۰۲/۰	۱/۱±۰۴/۰	۱۲۳±۱/۹	۳/۶±۲/۰
ایسکمی آکا ۱۰	۲/۱±۰۴/۰	۱۸/۱±۰۳/۰	۱۳۰±۳/۸	۸/۵±۳/۰
ایسکمی آکا ۲۵	۱۹/۱±۰۵/۰	۱۷/۱±۰۴/۰	۱۲۹±۷/۸	۱/۶±۱/۰
ایسکمی آکا ۵۰	۱۸/۱±۰۴/۰	۱۶/۱±۰۲/۰	۱۲۹±۶/۷	۳/۶±۲/۰



نمودار ۱- تأثیر I/R و ACA بر میزان میلوپروکسیداز کلیه. $p < 0.001$:** در مقایسه با گروه‌های کنترل، کنترل ACA و گروه شم ACA

بحث

در مطالعه حاضر، به طور کلی هیچ تغییری در پارامترهای التهابی پس از استفاده از ACA وجود نداشت، اما علائم التهاب در کلیه‌های دچار عمل I/R رخ داد. همچنین ACA اثر التهابی I/R بر کلیه را کاهش داد. علاوه بر این، داده‌های ما افزایش قابل توجهی در میزان بیان گیرنده Toll-like-4 (TLR-4)، TNF-α و IL-1β در موش‌های تحت کنترل I/R نشان داد، در حالی که ACA سطح این نشانگرهای التهابی را کاهش می‌دهد. به بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که TLR-4 با I/R افزایش می‌یابد و با مسدود کردن بیان این پروتئین، روند التهابی کاهش می‌یابد (۹). علاوه بر این، TLR-4 در مقایسه با دیگر گیرنده‌های

TLR در روند I/R از اهمیت بیشتری برخوردار است (۲۱).

نقش TNF-α در ایسکمی/خونرسانی مجدد بسیار پر رنگ است بطوری که TNF-α در مراحل اولیه ایسکم/خونرسانی مجدد بسیار افزایش می‌یابد و پروسه التهاب در کلیه پیوند یافته را به راه می‌اندازد (۱۳).

با توجه به اینکه آکاستین مقدار TNF-α در کلیه ایسکمی/خونرسانی مجدد را کاهش می دهد، می توان گفت که آکاستین توانائی این را دارد که التهاب ناشی از این پروسه را از همان ابتدا سرکوب کند.

همچنین IL-1β که متعاقب تولید TNF-α در کلیه‌ای که دچار ایسکمی/خونرسانی مجدد افزایش می‌یابد (۱۲) توسط آکاستین کاهش یافت. بنابراین می‌توان گفت که آکاستین مسیرهای مولکولی پائین دستی TNF-α را هم سرکوب می‌کند.

از طرف دیگر میلوپروکسیداز شاخص آسیب به کلیه است (۲۰). بنابراین نتایج ما نشان می‌دهد که پروسه ایسکمی/خونرسانی مجدد در تحقیق حاضر موجب آسیب کلیه شده که این موضوع مانند آنچه است که در عمل‌های پیوند کلیه اتفاق می‌افتد. همچنین مصرف آکاستین توانسته است آسیب کلیه را کاهش داده و به حد نرمال نزدیک کند.

علاوه براین یون منیزیم که شاخص عملکردی کلیه است (۳) در ایسکمی/خونرسانی مجدد کاهش یافته بود که نشان دهنده عملکرد نادرست کلیه به دنبال این پروسه است. این در حالی است که مصرف آکاستین این شاخص عملکردی کلیه را بهبود بخشیده است.

نتیجه‌گیری

ایسکمی/خونرسانی مجدد که به مدت ۶۰ دقیقه طول بکشد موجب بروز آبشارهای التهابی می‌شود که این امر به نوبه خود موجب آسیب به کلیه و کاهش کارائی آن می‌شود. این در حالی است که مصرف آکاستین با حداقل دوز، در تمام مراحل کمک به بهبود عوارض ناشی از ایسکمی/خونرسانی مجدد می‌شود.

منابع

1. Antonelou, M., Michaëlsson, E., Evans, R.D.R., Wang, C.J., Henderson, S.R., Walker, L.S.K., Unwin, R.J., Salama, A.D., RAVE-ITN, Investigators. 2020. Therapeutic Myeloperoxidase Inhibition Attenuates Neutrophil Activation, ANCA-Mediated Endothelial Damage, and Crescentic GN. *Journal of American Society of Nephrology*, 31(2):350-364.

2. Chehrei, S., Moradi, M., Ghiabi, H. R., Falahi, M., Kaviani, S., Ghanbari, A. 2017. Pentoxifylline besides naltrexone recovers morphine-induced inflammation in male reproductive system of rats by regulating Toll-like receptor pathway. *Andrologia*, 49(9): 27925265.

3. Ferrè, S., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J. 2011. Insight into renal Mg^{2+} transporters. *Currentopinion in Nephrology and Hyperte nsion*, 20(2):169-176.

4. Ha, S.K., Moon, E., Lee, P., Ryu, J.H, Oh, M.S., Kim, S.Y. 2012. Acacetin attenuates neuroinflammation via regulation the response to LPS stimuli in vitro and in vivo. *Neurochemistry Research*, 37:1560-1567.

5. Hesketh, E.E., Czopek A, Michael Clay, M., Borthwick, G., Kluth, D., Hughes, J. 2014. Renal ischaemia reperfusion injury:a mouse model of injury and regeneration. *Journal of Visualized Experiments*, 88: 51816.

6. Le Clef, N., Verhulst, A., D'Haese, P.C., Vervaet, B.A. 2016. Unilateral renal ischemia-reperfusion as a robust model for acute to chronic kidney injury in mice. *PLoS One*, 11(3): e0152153.

7. Li, G.R., Wang, H.B., Qin, G.W., Jin, M.W., Tang, Q., Sun, H.Y. 2008. Acacetin, a natural flavone, selectively inhibits human atrial repolarization potassium

currents and prevents atrial fibrillation in dogs. *Circulation*, 117:2449-2457.

8. Mahmoudzadeh, L., Najafi, H., Ashtiyani, S.C., Yarijani, Z.M. 2017. Anti-inflammatory and protective effects of saffron extract in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology*, 22:748-754.

9. Meng, X., Wei, M., Wang, D., Qu, X., Zhang, K., Zhang, N., Li, X. 2020. The protective effect of hesperidin against renal ischemia-reperfusion injury involves the TLR-4/NF-kappaB/iNOS pathway in rats. *Physiology International*,107(1):82-91.

10. Najafi, H., Owji, S.M., Kamali-Sarvestani, E., Moosavi, S.M. 2016. A1-adenosine receptor activation has biphasic roles in development of acute kidney injury at 4 and 24 h of reperfusion following ischaemia in rats. *Experimental Physiology*, 101:913-31.

11. Palladino, M.A., Johnson, T.A., Gupta, R., Champman, J.L. 2007. Members of the toll like receptor family of innate immunity patternrecognition receptors are abundant in the male rat reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 76: 958-964.

12. Prieto-Moure, B., Lloris-Carsí, J.M., Belda-Antolí, M., Toledo-Pereyra, L.H., Cejalvo-Lapeña, D. 2017. Allopurinol Protective Effect of Renal Ischemia by Downregulating TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 Response. *Journal of Investigative Surgery*, 30(3):143-151.

13. Sancak, E.B., Turkön, H., Çukur, S., Erimsah, S., Akbas, A., Gulpinar, M.T., Toman, H., Sahin, H., Uzun, M. 2016. Major Ozonated Autohemotherapy Preconditioning Ameliorates Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *Inflammation*, 39(1):209-217.

14. Sharfuddin, A.A., Molitoris, B.A. 2011. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature Reviews Nephrology*, 7(4):189-200.

15. Shim, H.Y., Park, J.H., Paik, H.D., Nah, S.Y., Kim, D.S., Han, Y.S. 2007. Acacetin-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells involves caspase cascade, mitochondria-mediated death signaling and SAPK/JNK1/2-c-Jun activation. *Molecules and Cells*, 24:95-104.

16. Shiravi, A., Jalili, C., Vaezi, G., Ghanbari, A., Alvani, A. 2020. Acacetin Attenuates Renal Damage-Induced by Ischemia/Reperfusion with Declining Apoptosis and Oxidative Stress in Mice. International *Journal of Preventive Medicine*, 11:22.

17. Shokri, V., Jalili, C., Raissi, F., Akhshi, N., Ghanbari, A. 2020. Evaluating the effects of acacetin versus a low dose of cisplatin drug on male reproductive system and kidney in mice: With emphasis on inflammation process. *Andrologia*, 52(1): e13444.

18. Varga, G., Ghanem, S., Szabo, B., Nagy, K., Pal, N., Tanczos, B., Somogyi, V., Barath, B., Deak, A., Peto, K., Nemeth, N. 2019. Renal ischemia-reperfusion-induced metabolic and micro-rheological alterations and their modulation by remote organ ischemic preconditioning protocols in the rat. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 71(2):225-236.

19. Wang, B., Bai, M., Bai, Y., Li, Q. 2010. Liver injury following renal ischemia reperfusion in rats. *Transplantation Proceedings*, 42(9): 3422-3426.

20. Yang, W.J., Liu, C., Gu, Z.Y., Zhang, X.Y., Cheng, B., Mao, Yl. 2014. Protective effects of acacetin isolated from Z iziphora clinopodioides Lam.(Xintahua) on neonatal rat cardiomyocytes. Chinese Medicine, 9: 28.

21. Zhao, H., Perez, J.S, Lu, K., George, A.J, Ma, D. 2014. Role of Toll-like receptor-4 in renal graft ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306(8):801-811.

Inflammation Reduction by Acacetin Caused by Renal Ischemia-Reperfusion in Rats

Alvand Alwani[1], Abdul Hossein Shiravi[1], Ali Ghanbari[2*], Gholamhassan Vaezi[1], Siros Jalili[2]

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2- Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

Abstract

Ischemia/reperfusion occurs for a number of reasons; the most important of all is the closure of the renal arteries during renal transplantation. Inflammation is one of the most important mechanisms that occurs during ischemia / renal perfusion. Acacetin is a natural flavonoid with many healing properties. This study has investigated the effect of Acacetin ischemia / renal reperfusion inflammation on mice. 84 male balb/ c mice were randomly divided into 12 groups (each group consisted of 7 heads). Groups included control, sham, ischemia, casting control, casting sham, and ischemia/reperfusion. Ischemia was performed by closing the left renal artery for 60 minutes. Acacetin groups received this substance in 10, 25, and 50 doses mg/kg intraperitoneally. Kidney tissue hobby samples were used to measure cytokines including alpha necrosis factor, interleukin 1 beta, and toll like receptor 4 as well as myeloperoxidase. The levels of serum ions prepared from the cardiac blood of rats were evaluated. The levels of inflammatory cytokines in the ischemia/reperfusion group were significantly increased ($p < 001$). While these variables did not show significant changes in the groups receiving Acacetin. Myeloperoxidase levels were significantly increased in ischemia/reperfusion groups ($p < 001$). While these variables did not show significant changes in the groups receiving Acacetin,

Keywords: Ischemia/reperfusion, Acacetin, Inflammation, Kidney