

## ESR 法によるラット腎阻血再灌流における NOHb の測定

斎藤和歌<sup>1</sup><sup>1</sup>埼玉医科大学放射線医学教室

## はじめに

一酸化窒素 (Nitric oxide, 以下 NO) は、血管内皮細胞由来弛緩因子をはじめ<sup>1)</sup>、神経伝達物質、マクロファージ・好中球の殺菌作用など、様々な役割を演じている常磁性物質であり<sup>2)~4)</sup>、脳や心臓、肝臓などの臓器阻血再灌流時に、NO が発生することも知られている<sup>5)~7)</sup>。腎には様々な状況で阻血再灌流が起き、それに伴う NO の発生が知られている<sup>8),9)</sup>。しかし、発生量や経時の変化、阻血再灌流障害における役割については不明な点も多い。

血液中に放出された NO は、赤血球内に入り nitrosyl hemoglobin (以下 NOHb) を形成する<sup>10)</sup>。NOHb は電子スピン共鳴 (electron spin resonance, 以下 ESR) 法で特徴的な三峰性微細構造として検出できる<sup>11)</sup>。本研究では、ラット腎阻血再灌流モデルにおいて、NO 由来の NOHb を ESR 法を用いて、静脈血を全血のまま試料とし、阻血中から再灌流 60 分後まで経時的に測定した。同時に、ESR 法の結果と比較するため、血球成分を試料とし、NO 産生の指標となる NO 関連物質 (nitrosyl hemoproteins / S-nitrosothiols / nitrite / nitrate) を、nitrite 高感度測定法の一つである蛍光法<sup>12)</sup> を改変し

て<sup>13)</sup> 測定した。血圧、腎血流量、静脈酸素分圧、逸脱酵素の変化も測定し、腎阻血再灌流障害における NO の役割を考察した。

## 対象と方法

Sprague-Dawley 種ラット、雄 28 匹 (体重 320~520 g, 平均 442 g) を、A 群 (n=8) : 両側腎動脈を 45 分間阻血した後再灌流する群、B 群 (n=7) : 再灌流直前に NO 合成酵素阻害剤を静注する群、C 群 (n=7) : 非阻血再灌流群 (sham operation), D 群 (n=6) : 75 分間阻血後再灌流する群、の 4 群に分けて実験を行った。

A 群の手術は、以下の通りに行った。前日夜から絶食させたラットをチアミラールナトリウム (50 mg/kg) で腹腔内麻酔し、背臥位で四肢を固定。左大腿動脈内に挿入したカテーテルに血圧計を接続し、左大腿静脈内のカテーテル先端を下大静脈に置いた。その後開腹し、下大静脈内のカテーテル先端が、腎静脈合流部の頭側、肝静脈合流部より尾側にあることを確認した後、固定。両側の腎動静脈は剥離後、クリップでクランプした。45 分間阻血後、クリップをはずし再灌流させた。

採血は、開腹後阻血前 (コントロール)、阻

キーワード ischemia-reperfusion, kidney, ESR

血後40分、再灌流後15分、30分、60分で各2ml行い、ESR測定、蛍光測定、逸脱酵素測定、静脈血液ガス分析に用いた。採血ごとに採血量と同量のヘスパンダー (hydroxyethylated starch, 杏林製薬) を代用血漿として静注し、採血による血圧の低下を防いだ。体温低下防止には保温パッドを用いた。各採血の前に、両側の腎実質血流量を laser flow meter (ALF2000, Advanced Co.Ltd) で測定した。

B群はA群と同様に行い、再灌流直前にNO合成酵素阻害剤 (N-nitro-L-arginine methyl ester : L-NAME) を 50 mg/kg 静注した。

C群は腎動静脈の剝離までA群と同様に行い、阻血再灌流は行わなかった。採血は、A群と同様の時間帯に行った。

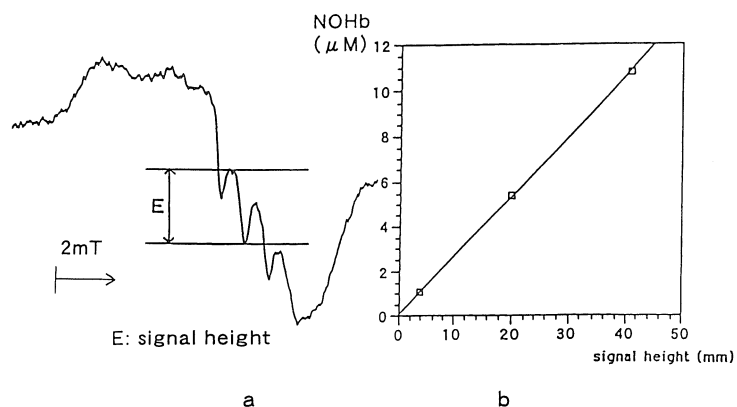
D群はA群と同様に腎動静脈を剝離し、阻血を75分間行った。採血は、開腹後阻血前 (コントロール)、阻血後60分、75分、再灌流後15分、30分に行った。

ESR測定は、以下の方法で行った。採血後直ちに全血0.4mlをESR測定用試料管に入れ液体窒素で凍結し、ESR測定装置にて測定を

行った。使用装置は、JEOL-RE-1X (X-band, 100 kHz) で、測定条件は、中心磁場：315 mT。掃引時間：20秒。磁場掃引幅：±25 mT。磁場変調幅：0.1 mT。増幅率：200。時定数：0.03秒。マイクロ波出力：8 mW。マイクロ波周波数：9.4 GHz。積算回数：20回である。

窒素雰囲気下で還元HbにNOガスを曝露して合成したNOHbを用い<sup>14)</sup>、NOHb濃度とESR法で得られるNOHbのシグナル強度の相関性を調べると比例関係が得られた。(相関係数：0.99) この結果を検量線として、実際の試料から得られるESRシグナルから、NOHb濃度を求めた。(Fig. 1a, b)

蛍光測定は、以下の手順で行った。全血試料を3000 rpm 10分間遠心して得られた血球成分を、生理食塩水で洗浄後1500 rpm 10分間2回遠心し、洗浄赤血球を得た。洗浄赤血球を1日以上凍結したのち室温で解凍し、18,000 rpm 15分間遠心し、上澄みを血球溶解液として採取した。血球溶解液をTris buffer (10 mM, pH 7.4) で希釈後、90°Cで30分間加熱した。この



**Fig. 1a:** Characteristic triplet of purified NOHb signal. E; height of the center of the triplet was regarded as signal height of NOHb. **b:** Correlation between concentration and signal height of NOHb. Correlation coefficient ;  $r = 0.99$ .

加熱により、NO 由来の NO 関連物質及びもともと血中に存在した nitrite, nitrate はすべて nitrate に酸化されていると考えた。その後 18,000 rpm 15 分間遠心し、上澄みを Ultrafilter で 7,000 rpm 10 分間遠心濾過して熱変性蛋白を除去した。濾過液を buffer で希釈し全量 1 ml とし、NADPH (500  $\mu$ M) 0.1 ml, Aspergillus 由来の Nitrate Reductase (0.83 unit/ml) 0.1 ml を加え、25 度の恒温槽で 20 分間反応させ、nitrate を nitrite に還元した。次に蛍光物質 DAN (2,3-diaminonaphthalene, 0.05 mg/ml, 0.62 M HCl 溶解液) を 0.12 ml 加え、10 分後に NaOH 0.06 ml を加えて蛍光強度を増加させ、得られた溶液を蛍光分光測定器 (Shimadzu RF-5000) で測定した。(Ext.: 365 nm, Em.: 465 nm)

検量線は測定ごとに、乾熱乾燥した nitrate K 標準液 (0, 0.1, 0.5, 1  $\mu$ M) によって作成した。

血球溶解液の Hb 値を測定 (ヘモグロビン B テストワコー使用) し、Hb 補正値を結果とした。

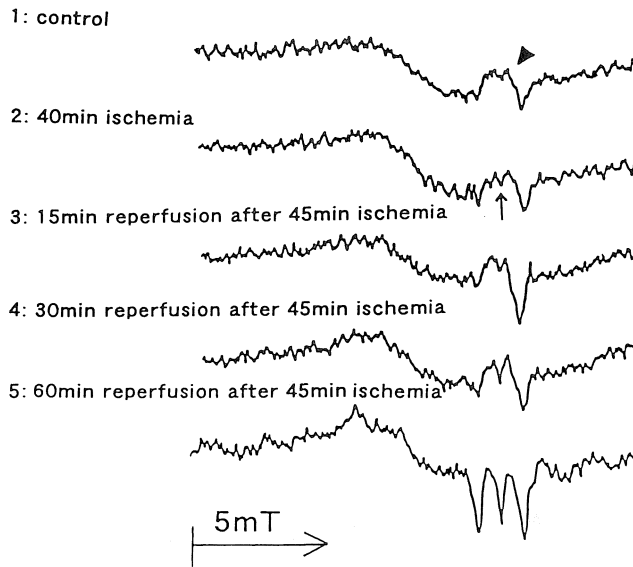
蛍光測定試料作成中に得られる血漿を用いて、lactate dehydrogenase (以下 LDH), aspartate aminotransferase (以下 AST) の測定を行った。測定キットは、CII テストワコーを用いた。

有意差判定は student t test を用い、 $p < 0.05$  を有意な差とした。

## 結 果

### 1) ESR signal

開腹後阻血前 (コントロール) には、未同定



**Fig. 2 :** Representation of NOHb signals of venous blood of rats with 45 minutes warm ischemia and reperfusion of bilateral renal arteries. 1 : Just before occlusion of bilateral renal arteries. (control) Unidentified free radical signal was detected. (arrow head) 2 : 40 minutes after starting to occlude bilateral renal arteries. A weak NOHb signal was detected. (arrow) 3 : 15 minutes after reperfusion, 4 : 30 minutes after reperfusion, 5 : 60 minutes after reperfusion. NOHb signal increased in size chronologically after reperfusion.

のフリーラジカルのシグナルが認められた。A群では、阻血40分において、 $g$  値 = 2.0 付近に NOHb シグナルに特徴的な三峰性超微細構造 (triplet) が出現した (Fig. 2)。NOHb のシグナルは、再灌流後、時間経過と共に増加傾向を示し、再灌流後 30 分、60 分では、有意な増加が認められた ( $P < 0.05$ )。L-NAME を前投与した B 群においては、時間経過に伴う NOHb の増加傾向は認められず、再灌流後 60 分には、B 群は A 群と比べて、有意に低い値を示した ( $P < 0.01$ )。C 群においては、時間経過に伴う増加傾向は認められたが、増加の程度は A 群より小さく、再灌流後 60 分の値は A 群は C 群と比べ、有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。B 群と C 群の間には、有意な差は認められなかった。阻血時間 45 分の A 群と阻血時間 75 分の D 群では、再灌流後 15 分、30 分の NOHb の値に有意差は認められなかった (Fig. 3)。

また、コントロール時に未同定フリーラジカルのシグナルに重なって、NOHb のシグナル

が認められた例が、27 例中 12 例に認められた。このうちの 8 例は、手術時の出血量が多く一過性の低血圧を起こした症例であった。手術中の出血量が多かった 12 例のうち 8 例で、コントロール時に NOHb のシグナルが認められ、出血の少なかった 15 例中のうち、コントロール時に NOHb のシグナルが認められたのは 4 例のみであった。

## 2) 蛍光測定法

A 群は、コントロールで  $20.2 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  Hb の NO 関連物質が認められ、時間経過と共に増加し、再灌流後 60 分においては  $57.8 \mu\text{mol}/\text{mmol}$  Hb に増加した。B 群は、時間経過に伴う増加は認めず、再灌流後 60 分には A 群と比べて有意に低値を示した。C 群もわずかな増加を認めたが、再灌流後 60 分の値は、A 群が C 群より有意に高かった。D 群は阻血中から有意な増加を認め、時間経過と共に増加した。A 群と D 群の間には明らかな有意差は認められなかった (Fig. 4)。

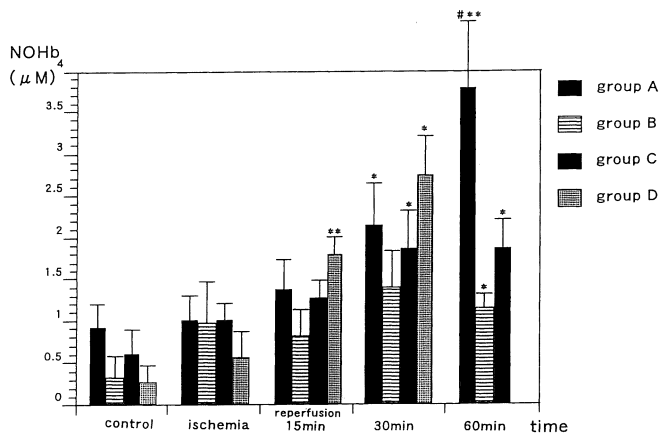
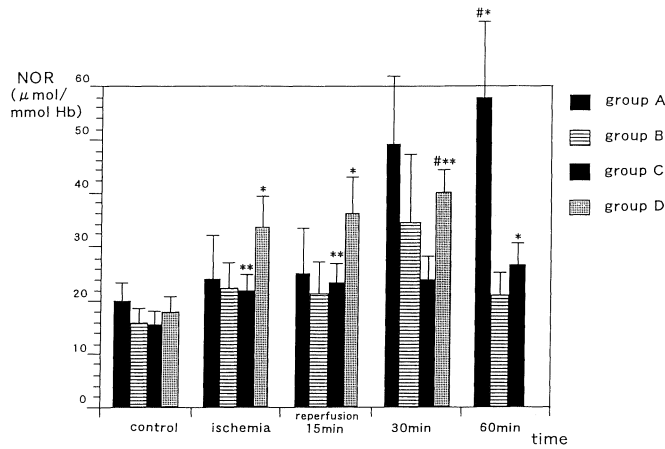


Fig. 3 : Changes of NOHb concentration in venous blood of rats measuring by ESR spectroscopy. Each bar represents the mean  $\pm$  SE. The bar of ischemia of group A, B represents 45 minutes after starting ischemia, group C is the same time to group A, and group D is 60 min after starting ischemia. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  when compared with control by Student's t test for paired determination. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  when compared with group C by Student's t test for unpaired determination.



**Fig. 4** : Changes of NO related compounds (NOR) in venous blood of rats measuring by fluorometry. Each bar represents the mean  $\pm$  SE. The bars of ischemia of group A, B represent 45 minutes after starting ischemia, group C is the same time to group A, and group D is 60 min after starting ischemia. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  when compared with control by Student's t test for paired determination. #  $P < 0.05$  when compared with group C by Student's t test for unpaired determination.

**Table 1.** Physiological Data of Rats with Renal Ischemia-reperfusion

	Vein saturation O <sub>2</sub> (mmHg)				
	control	ischemia	reperfusion 15 min	30 min	60 min
groupA	65.8 $\pm$ 3.9	63.6 $\pm$ 5.4	61.1 $\pm$ 8.1	49.9 $\pm$ 8.9	28.5 $\pm$ 7.1 * *
groupB	69.3 $\pm$ 4.7	62.2 $\pm$ 6.1	56.6 $\pm$ 8.2	54.7 $\pm$ 6.2 * *	23.9 $\pm$ 9.6 * *
groupC	63.7 $\pm$ 5.0	64.8 $\pm$ 4.1	59.2 $\pm$ 2.1	56.7 $\pm$ 3.8	43.1 $\pm$ 3.4 * *
groupD	68.9 $\pm$ 4.4	65.0 $\pm$ 4.6	52.3 $\pm$ 10.7	36.7 $\pm$ 8.5 * #	

	Renal flow (ml/min/100g)				
	control	ischemia	reperfusion 15 min	30 min	60 min
groupA	23.3 $\pm$ 2.1	—	19.7 $\pm$ 2.8	19.9 $\pm$ 2.6	19.4 $\pm$ 2.3
groupB	28.0 $\pm$ 2.9	22.8 $\pm$ 1.7	16.1 $\pm$ 1.9 * *	15.3 $\pm$ 1.7 * *	11.1 $\pm$ 1.5 * *
groupC	24.5 $\pm$ 1.5	—	24.3 $\pm$ 2.1	22.2 $\pm$ 2.2	22.5 $\pm$ 2.1
groupD	40.1 $\pm$ 4.1	—	22.2 $\pm$ 3.1 * *	18.2 $\pm$ 4.7 * *	

	Blood pressure (mmHg)				
	control	ischemia	reperfusion 15 min	30 min	60 min
groupA	113 $\pm$ 4	110 $\pm$ 5	110 $\pm$ 4	109 $\pm$ 4	100 $\pm$ 8
groupB	121 $\pm$ 5	113 $\pm$ 5	140 $\pm$ 10 #	139 $\pm$ 7 # #	128 $\pm$ 18
groupC	118 $\pm$ 6	114 $\pm$ 5	125 $\pm$ 5	108 $\pm$ 6	108 $\pm$ 5
groupD	119 $\pm$ 8	119 $\pm$ 5	128 $\pm$ 3	117 $\pm$ 6	

Each value represents the mean  $\pm$  SE. Ischemia of group A, B and C are 40 minutes after starting ischemia. The first value of ischemia of group D is 60 minutes, the followed one is that of 75 minutes after starting ischemia. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  when compared with control by Student's t test for paired determination. #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  when compared with group C by Student's t test for unpaired determination.

Table2. Biochemical Data of Rats with Renal Ischemia-reperfusion

	LDH (IU)				
	control	ischemia	reperfusion 15 min	30 min	60 min
groupA	737± 94	834±113	1138±203*	1190±110*#	1404±198#
groupB	932±134	992±147	1412±234	1426±132*#	2484±425*#
groupC	732±112	814± 56	902±134	733±56	804±124
groupD	908±110	969±140	1294±130#	1393±217#	
		1116±174			

	AST (IU)				
	control	ischemia	reperfusion 15 min	30 min	60 min
groupA	69± 5	81±10	114±12	147±22*	219±42*
groupB	81± 4	77±11	120±17	151±29	365±185
groupC	101± 5	110±14	116±20	103±16	125±41
groupD	91±10	100±13	130±11*	146±29	
		104± 5			

Each value represents the mean±SE. Ischemia of group A, B and C are 40 minutes after starting ischemia. The first value of ischemia of group D is 60 minutes, the followed one is that of 75 minutes after starting ischemia. \*P<0.05 when compared with control Student's t test for paired determination. #P<0.05, ##P<0.01 when compared with group C by Student's t test for unpaired determination.

### 3) 静脈血酸素飽和度

静脈血酸素飽和度は、時間経過と共に低下傾向を示し、特に再灌流後には、全群ともコントロール値と比べ、有意な低値を示した (p<0.05) (Table 1)。

### 4) 腎血流量

C群においては、時間経過に伴う腎血流量の明らかな変化は認められなかった。A群においては、再灌流後、コントロール値よりも低い値であったが、時間経過に伴う有意な変化は認められなかった。B群においては、再灌流後の腎血流は有意な減少を示し (P<0.01)、再灌流後も減少傾向が続いた。D群においては、再灌流後の腎血流はコントロールと比べて約50%で、有意な減少を示した (P<0.01) (Table 1)。

### 5) 動脈血圧

B群においては、L-NAME 静注後の再灌流後15分に、コントロールと比較して有意な血圧上昇が認められた (P<0.05)。また、B群の再灌流後15分、30分の血圧は、A群やC群と比べ、有意に高値だった (P<0.05)。A, C, D群では、時間経過に伴う軽度の血圧低下傾向が認められた (Table 1)。

### 6) 逸脱酵素

A群においてはLDH, AST値は、時間経過に伴う増加が認められた。B群も、時間経過と共に上昇傾向を示したが、特に再灌流後60分での値が高かった。C群では、時間経過に伴う明らかな上昇傾向はなかった。D群も、時間経過に伴う増加傾向が認められた (Table 2)。

## 考 察

NOは不対電子を持つ常磁性物質で、他の常磁性物質や金属タンパクに高親和性を持つ<sup>10)</sup>。血中に放出されたNOの一部は、赤血球内に入りNOHbを形成することが知られている。NOHbは液体窒素下で、特徴的な三峰性超微細構造のESRシグナルとして検出できる<sup>11)</sup>。

本研究におけるESR法によるNOHbの測定では、ラット腎の45分間の温阻血において、NOは、開腹手術後または阻血中から既に発生しており、再灌流後60分までは、時間経過に伴って増加することがわかった。Sham operation群においても、時間経過に伴うNOの増加は認められたが、増加の程度は、阻血再

灌流群より有意に小さかった。これらのことから、腎阻血再灌流による NO 発生に関与する因子として、開腹手術によるストレス、腎阻血再灌流の 2 因子が考えられる。NOHb は本研究では、開腹手術から 105 分間、阻血再灌流から 60 分間の間、時間経過に伴う増加を続けた。阻血時間が NO 発生に及ぼす影響を調べるために、阻血時間を 75 分間に延長し、45 分間の群と比較した。しかし両群間に有意差を認めなかったことから、本実験の条件においては、NO 発生に関与する因子として阻血時間の寄与は小さいと考えられた。NO 合成酵素 (NOS) には、主にマクロファージや好中球で合成される inducible NOS と、神経細胞に含まれる neuronal NOS、血管内皮細胞に含まれる endothelial NOS の 3 種類がある<sup>4)</sup>。

inducible NOS は cytokine による刺激により messenger RNA が発現し、inducible NOS のタンパク合成が亢進し、多量の NO が合成される<sup>2)</sup>。従って刺激を受けてから NO の合成までには数時間が必要である。neuronal NOS および endothelial NOS は、短期間における少量の NO 発生に携わる<sup>12)</sup>。endothelial NOS による NO は、可溶性グアニレートシクラーゼを活性化し、血管平滑筋を弛緩させる<sup>3)</sup>。腎阻血再灌流後には、腎血管の内皮細胞が膨化し血管抵抗が上昇し、腎血流量が低下する。この血行動態の障害に対して、endothelial NOS による NO は、防護的な役割を果たすと言われている<sup>8),9)</sup>。

本研究においては、再灌流直前に NOS 競争阻害剤の一つである L-NAME を静注したところ、NO の生成量は、再灌流後増加せず、60 分後には L-NAME を静注しない群と比べ、有意に低値を呈した。また、再灌流後 15 分には有意な血圧上昇が認められ、再灌流後の腎血流量は、L-NAME 静注群では非静注群と比較し、腎血流の低下の程度が強い傾向が認められた。このように短期間で NO 合成が阻害され、阻害により腎血流量の低下傾向が認められることから、腎阻血再灌流初期においては

endothelial NOS によって NO が合成され、腎血管の autoregulation に有用な役割を果たしていることが示唆された。

組織の障害程度の指標として逸脱酵素の測定が有用とされている<sup>15)</sup>。本研究においては、阻血再灌流群 (A, D 群) 及び L-NAME 投与阻血再灌流群 (B 群) で時間経過に伴う上昇が認められた。LDH においては、特に L-NAME を静注した B 群の再灌流後の増加が際立っていた。これは、L-NAME による腎組織への直接障害の影響も否定できないが、NO 合成酵素の阻害による NO の枯渇の結果、腎組織が障害を受け LDH の上昇を来したと推測される。

ESR 法による NOHb の測定は、未処理の全血を液体窒素で凍結させるだけで測定でき、簡便な方法と言える。しかし、NOHb のシグナルは、血液酸素飽和度の変化により、Hb が 5 配位体から 6 配位体に変化し、それに伴い信号強度が変化することが指摘されている<sup>16)</sup>。また、発生した NO 全量のうち Hb に結合するのは一部であること、共存するセルロプラスミンや他のラジカルのシグナルの影響を受ける可能性があることなどから、ESR 法は定量性にかける場合がある。そこで我々は、Misko らによる蛍光試薬による高感度 NO 法を改変し、血球内の NO 関連物質を測定し、本 ESR 法による定量値と比較した。蛍光法においても、手術によるストレス、阻血再灌流や時間経過による増加、また L-NAME による阻害が認められ、ESR 法による結果と矛盾する点はなかった。

ESR 法による NOHb の測定は、NO の直接的な測定方法ではないが、蛍光測定法などの他の測定法と併用することで、より実際の NO 発生量の動向を測定することができると考えられた。

## 結 語

ラット腎阻血再灌流における NO の発生量を ESR 法と蛍光法を用いて測定した。NO は、

手術後または阻血中から発生し、再灌流後は時間経過と共に増加した。また、L-NAMEにより有意に阻害された。

腎阻血再灌流によるNOは、endothelial NOSによって合成され阻血再灌流後の autoregulation の回復に有用な役割を果たすと考えられた。

稿を終えるに当たり、ご指導、ご校閲を賜った埼玉医科大学放射線医学教室平敷淳子主任教授に深甚なる謝意を表します。また、測定方法、データ分析のご指導、ご助言をいただいた同大学第一生化学教室坂岸良克教授、菌田 勝講師、宮崎 孝助手に深謝いたします。

本論文の要旨は、第23回日本磁気共鳴医学会大会において発表した。

#### 文 献

- 1) Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288 : 373-376, 1980.
- 2) Wei Xq, Charles IG, Smith A, et al.: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, 375 : 408-411, 1995.
- 3) Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al.: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, 377 : 239-242, 1995.
- 4) Snyder SH: No endothelial NO. *Nature*, 377 : 196-197, 1995.
- 5) Sato S, Tominaga T, Ohnishi T, et al.: Electron paramagnetic resonance study on nitric oxide production during brain focal ischemia and reperfusion in the rat. *Brain research*, 647 : 91-96, 1994.
- 6) Zweier JL, Wang P, Kuppusamy P: Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem*, 270 : 304-307, 1995.
- 7) Tong T MA, Ischiropoulos H, Brass CA: Endotoxin-stimulated nitric oxide production increases injury and reduces rat liver chemiluminescence. *Gastroenterology*, 108 : 463-469, 1995.
- 8) Lopez-Neblina F, Paez AJ, Toledo H, et al.: Role of nitric oxide in ischemia/reperfusion of the rat kidney. *Circ Shock*, 44 : 91-95, 1995.
- 9) Cristol JP, Thiemeermann C, Mitchell JA, et al.: Support of renal blood flow after ischaemic-reperfusion injury by endogenous formation of nitric oxide and of cyclo-oxygenase vasodilator metabolites. *Br J Pharmacol*, 109 : 188-194, 1993.
- 10) Kerwin, Jr. JF, Lancaster, Jr JR, Feldman PL. *J Medic Chem*, 38 : 4343-4345, 1995.
- 11) Oda H, Kusumoto S, Nakajima T: Nitrosyl-hemoglobin formation in the blood of Animals exposed to nitric oxide. *Arch Environ Health*, 30 : 453-456, 1975.
- 12) Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, et al.: A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem*, 214 : 11-16, 1993.
- 13) 菌田 勝, 宮崎 孝, 斎藤和歌, 他: 磁気共鳴と医学 vol.8 印刷中
- 14) Sonoda M, Hashimoto T, Satomi A, et al.: Diazotization reaction of nitric oxide trapped by hemoglobin. *Life Sci*, 55 : 199-204, 1994.
- 15) 岩崎洋治, 尾崎 粹, 浅野武秀: 移植腎の viability. *外科*, 38 : 442-446, 1976.
- 16) Kosaka H, Sawai Y, Sakaguchi H, et al.: ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine-treated rats. *Am J Physiol*, 35 : C 1400-1405, 1994.



## Nitrosyl Hemoglobin Production during Ischemia-reperfusion of Rat Kidney

Waka SAITO

*Department of Radiology, Saitama Medical School  
38 Morohongou, Moroyama-tyou, Iruma-gun, Saitama 350-04*

We measured nitrosyl hemoglobin by electron spin resonance spectroscopy during early reperfusion after 45 min of warm ischemia of rat kidney.

The study population (28 male Sprague-Dawley rats) was divided into four groups: group A: 45 min ischemia-reperfusion (n=8), group B: treated with L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) (n=7), group C: sham operation (n=7), group D: 75 min ischemia-reperfusion (n=6).

In group A, a weak nitrosyl hemoglobin signal was initially detected in the ischemic phase, and increased with time after reperfusion. Nitrosyl hemoglobin signals were also detected in the sham-operation group. However, these signals were significantly smaller than those in the ischemia-reperfusion groups. The signals in group B were significantly inhibited after reperfusion, and those in group D were not significantly different from those in group B.

Various methods can be used to measure NO; fluorometry, chemiluminescence, etc. In this study ESR spectroscopy gave results comparable to those by fluorometry.

In conclusion, ESR spectroscopy is believed to be much simpler than other methods for detecting nitrosyl hemoglobin during renal ischemia-reperfusion.