

## کاهش پروتئین اوری ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد توسط یک مهار کننده انتخابی نیتریک اکساید سنتاز در کلیه رت

مریم زحمتکش<sup>۱</sup>، مهری کدخدایی<sup>۲</sup>، فرشته گلاب<sup>۳</sup>، حمیدرضا صادقی پور<sup>۴</sup>، علی اسلامی فر<sup>۵</sup>، ژاله تائب<sup>۶</sup>، علیرضا شمس<sup>۷</sup>

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** نفروتوکسیسیته ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد (IR) همراه با پروتئین اوری می باشد. گزارشاتی در مورد نقش iNOS (فرم القایی نیتریک اکساید سنتاز) در پروتئین اوری همراه با بیماری‌های کلیه وجود دارد. هدف این مطالعه بررسی اثر L-Nil (L-ایمینواتیل لیزین هیدروکلراید) به عنوان یک مهار کننده انتخابی iNOS، بر جلوگیری از پروتئین اوری کلیوی در ضایعات ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد می باشد.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه برای القای ایسکمی، شریان هر دو کلیه به مدت ۴۰ دقیقه مسدود و سپس ۶h پرفیوژن مجدد برقرار شد. رت‌ها به طور تصادفی در چهار گروه Sham-operated، Sham+L-Nil، IR و IR+L-Nil قرار گرفتند. در گروه‌های IR، رت‌ها ۱۵ دقیقه قبل از زمان ایسکمی، L-Nil (۳ mg/kg/IV) و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg و یا سالین دریافت کردند. عملکرد کلیه با اندازه گیری BUN و کراتینین پلاسما و همچنین فعالیت آنزیم ان-استیل بتا دی گلوکوزامینیداز ادرار ارزیابی شد. میزان دفع پروتئین توتال، آلبومین، پروتئین‌های با وزن ملکولی پایین و بالا توسط الکتروفورز sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) در نمونه‌های ادراری تعیین گردید. ساختار کلیه نیز توسط میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که IR به طور معنی داری باعث افزایش دفع پروتئین‌های با وزن ملکولی پایین و بالا می‌شود و L-Nil، از افزایش دفع پروتئین توتال، آلبومین و  $\alpha 1$  - میکروگلوبولین ناشی از IR جلوگیری می‌نماید. بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی نیز از دست رفتن میکروویلی‌ها در سلول‌های توبول پروگزیمال، میتوکندری آسیب دیده و تغییرات کف آلود در ساختار هسته و سیتوپلاسم را در گروه IR نشان داد ولی L-Nil باعث کاهش این تغییرات و کاهش پروتئین اوری توبولی گردید.

**بحث و نتیجه گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که iNOS در پروتئین اوری توبولی ایجاد شده توسط IR نقش مهمی دارد.

**واژه‌های کلیدی:** کلیه، ایسکمی - پرفیوژن مجدد، آنزیم نیتریک اکساید سنتاز، پروتئین اوری

ضمیمه مجله پزشکی ارومیه، سال نوزدهم، شماره دوم، ص ۴۱-۳۴، بهار ۱۳۸۷

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، صندوق پستی ۱۴۱۷۴، تلفن: ۶۶۴۱۹۴۸۴ - ۰۹۱۲۱۰۹۸۲۱۱

Email: kadkhodm@tums.ac.ir

محل اجرای تحقیق: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>۱</sup> استاد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>۲</sup> استاد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> دانشجوی PhD، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>۴</sup> استاد فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

<sup>۵</sup> استادیار پاتولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران

<sup>۶</sup> PhD بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران

<sup>۷</sup> استادیار میکروبی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی

## مقدمه

ایسکمی پرفیوژن مجدد (IR) که باعث ایجاد نفروتوکسیسیته می‌شود و همراه با کاهش عملکرد گلوومرولی و توبولی می‌باشد، یکی از علل مهم پروتئین اوری می‌باشد (۱). پروتئین اوری نه تنها به عنوان شاخصی از آسیب کلیوی است بلکه به عنوان شاخصی از بقاء بیمار در پیوند کلیه نیز می‌باشد (۲). بنابراین یک هدف درمانی مهم در نفرولوژی، کاهش پروتئین اوری می‌باشد. در حالی که ضایعات توبولی می‌تواند به صورت یک افزایش در دفع پروتئین‌های با وزن ملکولی پایین مثل  $\alpha_1$  - میکروگلوبولین و  $\beta_2$  - میکروگلوبولین مشخص شود، ضایعات گلوومرولی توسط افزایش میزان آلبومین در ادرار و افزایش دفع پروتئین‌های با وزن ملکولی بالا مانند ترانسفرین، IgG و  $\alpha_2$  - ماکروگلوبولین مشخص می‌شود (۳). مطالعات در مدل نارسایی حاد کلیه نشان می‌دهد که در طی IR و همچنین در مواقع رد شدن بافت در پیوند کلیه، iNOS القاء می‌شود (۴). چندین بررسی نشان می‌دهد که مهار iNOS باعث بهبود ضایعات ناشی از IR در کلیه می‌شود (۵،۶). همچنین گزارشاتی در مورد نقش iNOS در پروتئین اوری همراه با بیماری‌های کلیه وجود دارد (۷-۱۰) و یا این که مهار NOS توانسته است بر روند باز جذب توبولی اثر بگذارد (۱۱،۱۲).

بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر ال-ایمینواتیل لیزین هیدروکلراید (L-Nil) را که یک مهارکننده انتخابی iNOS می‌باشد، در مدل ایسکمی - پرفیوژن مجدد کلیه رت و پروتئین اوری ناشی از آن بررسی کنیم. تغییرات ساختاری کلیه ابتدا توسط میکروسکوپ نوری و سپس میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش کار

در این مطالعه از ۲۰ راس رت نر از نژاد Sprague-Dawley در محدوده وزنی ۲۷۰-۳۰۰ گرم با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد استفاده شد. همه گروه‌ها توسط تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (۶۰ mg/kg) بیهوش شدند و سپس با تزریق داخل وریدی ۶ mg/kg/h پنتوباربیتال سدیم، تا پایان آزمایش بیهوشی حفظ گردید. مدت زمان آزمایش در تمام گروه‌ها یکسان بود. در تمام این مدت حیوان گرم نگهداشته شده و به منظور اطمینان از باز بودن راه هوایی و تسهیل تنفس تراکئوتومی انجام شد. سپس شریان فمور به منظور مانیتور کردن فشار متوسط شریانی و ضربان قلب (Mean arterial pressure, MAP) و ورید فمور جهت تجویز دارو و انفوزیون مایعات کانول گذاری شد. مثانه به منظور جمع آوری ادرار کانول گذاری گردید. سپس با یک برش عرضی روی شکم، Renal pedicles نمایان شده و شریان هر دو

کلیه از بافت‌های اطراف به دقت جدا شد. پس از اتمام این مراحل یک گاز آغشته به نرمال سالین جهت جلوگیری از خشک شدن احشا روی شکم قرار داده شد و همچنین به مدت ۶۰ دقیقه به حیوان فرصت داده شد تا حیوان در وضعیت پایداری قرار گیرد. در گروه IR شریان‌های هر دو کلیه توسط کلمپ بولداگ به مدت ۴۰ دقیقه مسدود شده و سپس با باز کردن کلمپ به مدت ۶ ساعت پرفیوژن مجدد برقرار شد. در گروه‌های دیگر نیز تمام مراحل جراحی فوق انجام گردید ولی شریان‌های کلیه مسدود نشد. تمامی گروه‌ها یک انفوزیون مداوم سالین به میزان ۶ ml/kg/h دریافت کردند و در مدت زمان پرفیوژن مجدد در تمام گروه‌ها ادرار جمع آوری گردید. پروتکل جراحی توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران تصویب گردید.

پس از اتمام پروسه جراحی رت‌ها به طور تصادفی در یکی از ۴ گروه زیر قرار گرفتند (n=5):

- ۱- Sham-operated
- ۲- Sham+L-Nil
- ۳- IR
- ۴- IR+L-Nil

در گروه کنترل - جراحی یا Sham تمام مراحل جراحی فوق انجام گردید ولی شریان‌های کلیه مسدود نشد. رت‌ها در تمام مدت آزمایش (۴۰ دقیقه + ۶ ساعت) تحت بیهوشی بودند و یک تزریق بولوس سالین (۳/۰ میلی لیتر) و انفوزیون سالین به میزان ۶ ml/kg/h دریافت کردند. در گروه Sham+L-Nil تمام شرایط مانند گروه Sham بود با این تفاوت که رت‌ها به جای سالین یک تزریق بولوس L-Nil (۳ mg/kg/IV) و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg/h دریافت کردند. در گروه IR، ۱۵ دقیقه قبل از القای ایسکمی یک تزریق بولوس سالین انجام شده و سپس توسط کلمپ بولداگ به مدت ۴۰ دقیقه هر دو شریان کلیوی راست و چپ مسدود شد و از تغییر رنگ کلیه به منظور تایید انسداد استفاده شد. سپس با باز کردن کلمپ مدت ۶ ساعت پرفیوژن مجدد برقرار شد و در این مدت انفوزیون سالین به میزان ۶ ml/kg/h انجام گردید. در گروه IR+L-Nil تمام شرایط مانند گروه IR بود با این تفاوت که حیوانات ۱۵ دقیقه قبل از القای ایسکمی یک بولوس L-Nil (۳ mg/kg/IV) و انفوزیون آن را به میزان ۱ mg/kg/h دریافت کردند.

در انتهای آزمایش یک نمونه خون (۱ ml) از مسیر شریانی به منظور اندازه گیری شاخص‌های عملکردی کلیه و آسیب‌های ناشی از ایسکمی - پرفیوژن مجدد گرفته شد. نمونه، توسط سرنگ حاوی EDTA (5mg/ml) گرفته شد. و پس از سانتریفیوژ پلاسما جدا گردید. کراتینین (Cr) و BUN پلاسما به عنوان شاخص‌های

### یافته‌ها

در تمامی گروه‌ها مقدار MAP در زمان آزمایش با مقدار پایه (به ترتیب  $1.0/3 \pm 1.0/9$  و  $9/8 \pm 11.0$  میلی‌متر جیوه) تفاوت معنی داری نداشت. علاوه بر آن تجویز L-Nil اثری بر میزان MAP و تعداد ضربان قلب در مقایسه با گروه کنترل - جراحی یا Sham نداشت (یافته‌ها نشان داده نشده است).

چهل دقیقه ایسکمی و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد به طور معنی داری BUN ( $13/29 \pm 71/2$  در برابر  $1/74 \pm 11/6$  میلی گرم در دسی لیتر) و کراتینین ( $0.7 \pm 2/16$  در برابر  $0.41 \pm 0/49$  میلی گرم در دسی لیتر) را در مقایسه با گروه کنترل - جراحی یا Sham افزایش داد. تجویز L-Nil به طور معنی داری مانع افزایش BUN ( $4/97 \pm 40/4$ ) و کراتینین ( $1/39 \pm 0/08$ ) نسبت به گروه IR شد (جدول شماره ۱). همچنین IR کلیه به طور معنی داری میزان فعالیت NAG را در ادرار در مقایسه با گروه کنترل-جراحی یا Sham افزایش داد ( $13/96 \pm 2/16$  U/l vs  $78/12 \pm 8/38$ ). تجویز L-Nil به طور معنی داری مانع افزایش فعالیت NAG نسبت به گروه IR شد (جدول شماره ۱،  $2/30 \pm 33/6$ ).

پروتئین اوری در گروه کنترل - جراحی یا Sham مشاهده نشد (شکل ۱). ایسکمی و پرفیوژن مجدد به طور معنی داری باعث افزایش دفع پروتئین‌ها، هم با وزن ملکولی پایین و هم با وزن ملکولی بالا گردید. افزایش در دفع ادراری پروتئین توتال ( $5.43 \pm 0.6$  vs.  $0.156 \pm 0.05$  g/mmol Cr) آلبومین ( $3.45 \pm 0.39$  vs.  $0.101 \pm 0.03$ )، میکروگلوبولین ( $0.267 \pm 0.04$  vs.  $0.01 \pm 0.005$ )، ترانسفرین ( $0.336 \pm 0.12$  vs.  $0.0014 \pm 0.0018$ )، IgG ( $1.065 \pm 0.2$  vs.  $0.029 \pm 0.014$ ) کنترل-جراحی یا Sham مشاهده گردید (شکل ۱). تجویز L-Nil به طور معنی داری مانع افزایش دفع ادراری پروتئین توتال ( $2.30 \pm 0.7$ )، آلبومین ( $1.714 \pm 0.54$ ) و  $\alpha 1$  - میکروگلوبولین ( $0.101 \pm 0.02$ ) نسبت به گروه IR شد. L-Nil اثری روی دفع ادراری ترانسفرین ( $0.32 \pm 0.13$ ) و IgG ( $0.876 \pm 0.13$ ) نداشت (1 e&d).

در بررسی‌های بافت شناسی در گروه IR، دیلاتاسیون توبولی و از بین رفتن حاشیه مسواکی مشاهده شد. همچنین بعضی از فضاهای توبولی توسط مواد هیالینی بنام cast مسدود شده بودند. در بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی، شواهدی از دژنراسیون، مانند جسم سلولی تیره و چروکیده و واکوئل‌های باند به غشاء دیده شد. جسم سلولی تعدادی از این سلول‌ها حاوی سیتوپلاسم electron-dense، هسته‌ای با غشاء کنگره مانند، کروماتین پراکنده و لوله‌هایی شبیه رتی‌کولوم اندوپلاسمیک بودند. تعدادی از این

آسیب عملکرد گلوامرولی با روش اسپکتروفتومتری (آنالیزر هیتاچی ۷۰۴) به ترتیب در طول موج  $505$  و  $520$  نانومتر اندازه‌گیری شد. در مدت زمان پرفیوژن مجدد در تمام گروه‌ها ادرار جمع آوری گردید و حجم آن ثبت گردید. فعالیت ادراری ان - استیل بتا دی گلوکوزامینیداز (NAG) نیز به عنوان شاخص آسیب‌های توبولی با روش اسپکتروفتومتری در طول موج  $405$  نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۳).

پروتئین توتال ادراری توسط متد Bradford اندازه‌گیری شد (۱۴). نمونه‌های ادراری توسط الکتروفورز Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ارزیابی شدند. میزان دفع پروتئین‌های با وزن ملکولی پایین (آلبومین و  $\alpha 1$  - میکروگلوبولین) و پروتئین‌های با وزن ملکولی بالا (ترانسفرین و IgG) تعیین گردید. در هر یک از چاهک‌های ژل به میزان  $20$  میکرولیتر نمونه ادرار اضافه گردید و به مدت  $5$  دقیقه اجازه انتشار به داخل ژل داده شد. پلیت به مدت دو ساعت در یک محفظه  $12$  میلی آمپر و  $60$ - ولت قرار داده شد و در انتها توسط نیترات نقره رنگ آمیزی شد. مارک‌های توده ملکولی جهت تعیین پروتئین‌های جدا شده مورد استفاده قرار گرفت (۱۵). میزان دفع ادراری، به صورت نسبت کراتینین (g/ mmol) در نمونه‌های ادراری بیان گردید.

کلیه‌ها پس از خارج شدن و جدا نمودن کپسول و بافت چربی از وسط به دو نیمه تقسیم شدند. نیمی از آن در داخل فرمالین  $10\%$  جهت انجام مطالعات بافت شناسی فیکس گردید. و نیم دیگر آن توسط بافر فسفات گلو‌تار آل‌دئید  $2.5\%$  (pH=7.2) جهت بررسی با میکروسکوپ الکترونی (Leo 906, Ziess, Germany) فیکس گردید. پس از طی سه مرحله شستشو توسط بافر فسفات  $0/1$  مولار به مدت  $30$  دقیقه و فیکس شدن در اسمیوم تتروکساید (اسمیوم تتروکساید  $1\%$  در بافر فسفات به مدت یک ساعت)، نمونه‌ها در اتانل با درجات خلوص مختلف ( $25-100\%$ ) آب‌گیری شدند. پس از طی مراحل مختلف، سرانجام در رزین خالص به مدت دو روز در درجه حرارت  $68$  درجه سانتی‌گراد پلی‌مریزه شدند. سپس مقاطع بسیار نازکی ( $40-70$  nm) از آنها تهیه گردید که با استات اورانیل رنگ آمیزی شد. در نهایت نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی Leo 906 بررسی گردیدند.

در این تحقیق نتایج بر اساس برنامه آماری SPSS-10 و تست آنالیز واریانس یک طرفه مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه چندگانه از شاخص Duncan استفاده شد. اختلاف معنی دار در سطح  $P \leq 0/05$  در نظر گرفته شد. تعداد نمونه‌ها در هر گروه پنج می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM گزارش شده است.

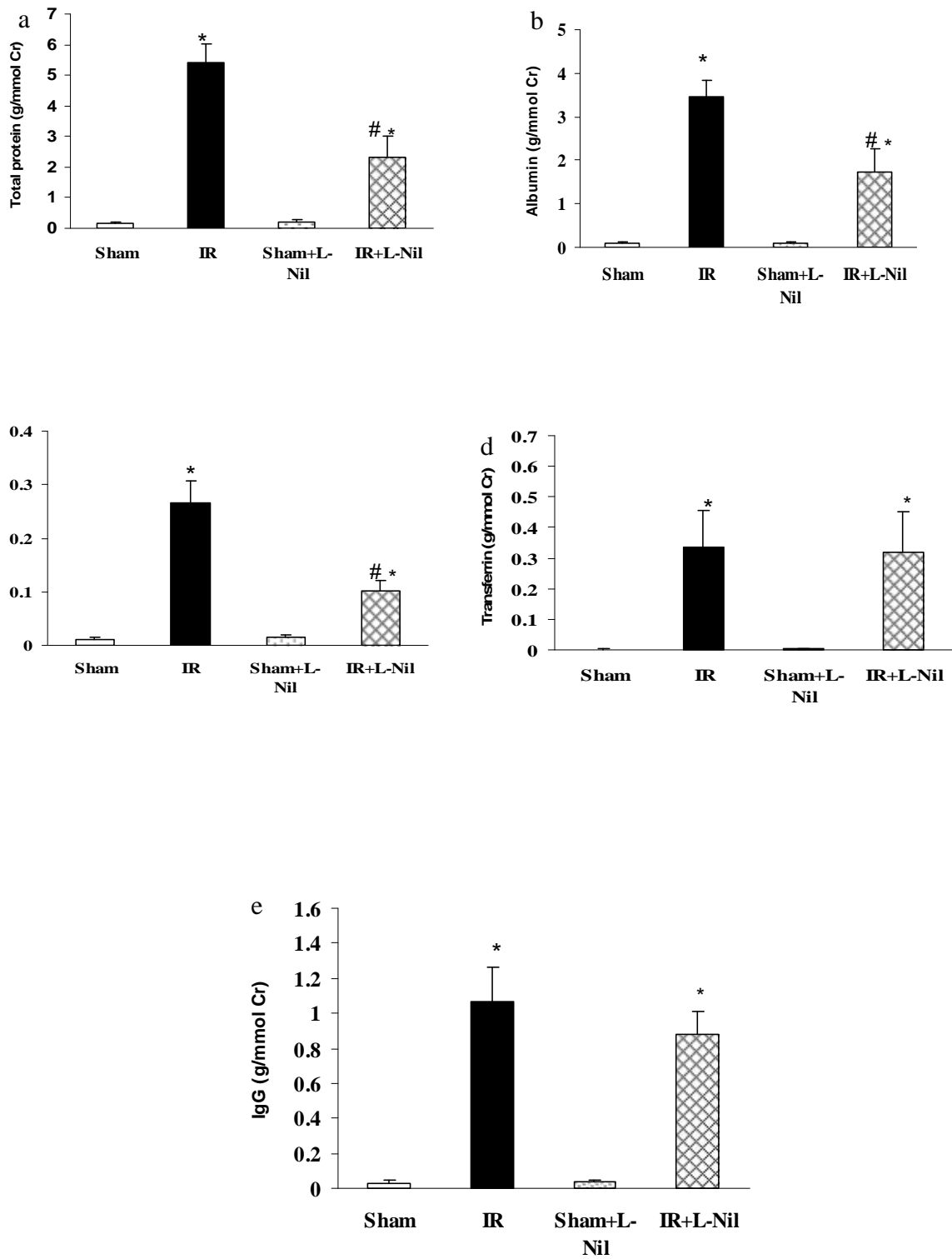
گلژی به صورت مجموعه گیریکنواختی از سیستم‌های پهن و عریض همراه با تعداد زیادی وزیکول‌های کوچک و متفاوت بود. میتوکندری‌ها در شکل و سایز متفاوت بودند. تعدادی از آنها پهن و حاوی ارگانل‌های سوسیس مانند و تعدادی دیگر چندین میکرون درازا داشتند. ساختار اصلی میتوکندری آنها شبیه میتوکندری مهره داران دیگر بود. هر ارگانل توسط دو غشاء داخلی و خارجی پوشیده شده بود. غشاء خارجی چین خورده بود و غشاء داخلی، فضای داخلی را مشخص می‌کرد. در تعدادی از این میتوکندری‌ها، کریستا مختصری غیر ارگانیزه بود ولی ساختار کلی طبیعی بود (شکل ۲-B&F).

سلول‌های چروکیده حاوی میتوکندری‌های متورم و غیر ارگانیزه بود. جهت کریستای آنها تغییر یافته و تعدادی از آنها حالت واکنش مانند پیدا کرده بودند (شکل ۲-A). میکروویلی‌های سلول‌های توپول پروگزیمال کوتاه و پراکنده بودند. همچنین تغییرات کف آلود در ساختار هسته و سیتوپلاسم مشاهده شد (شکل ۲-C). نکرروز توپولی نیز در گروه IR وجود داشت (شکل ۲-E). در گروه L-Nil، میکروویلی‌ها مختصری متورم بودند و یا تغییری پیدا نکرده بودند. سلول‌ها دارای هسته گرد و بزرگ بوده که در مرکز جسم سلولی آنها قرار داشت. هسته طبیعی آنها به صورت گرد، کروی و بزرگ نمایان بود (شکل ۲-D). دستگاه

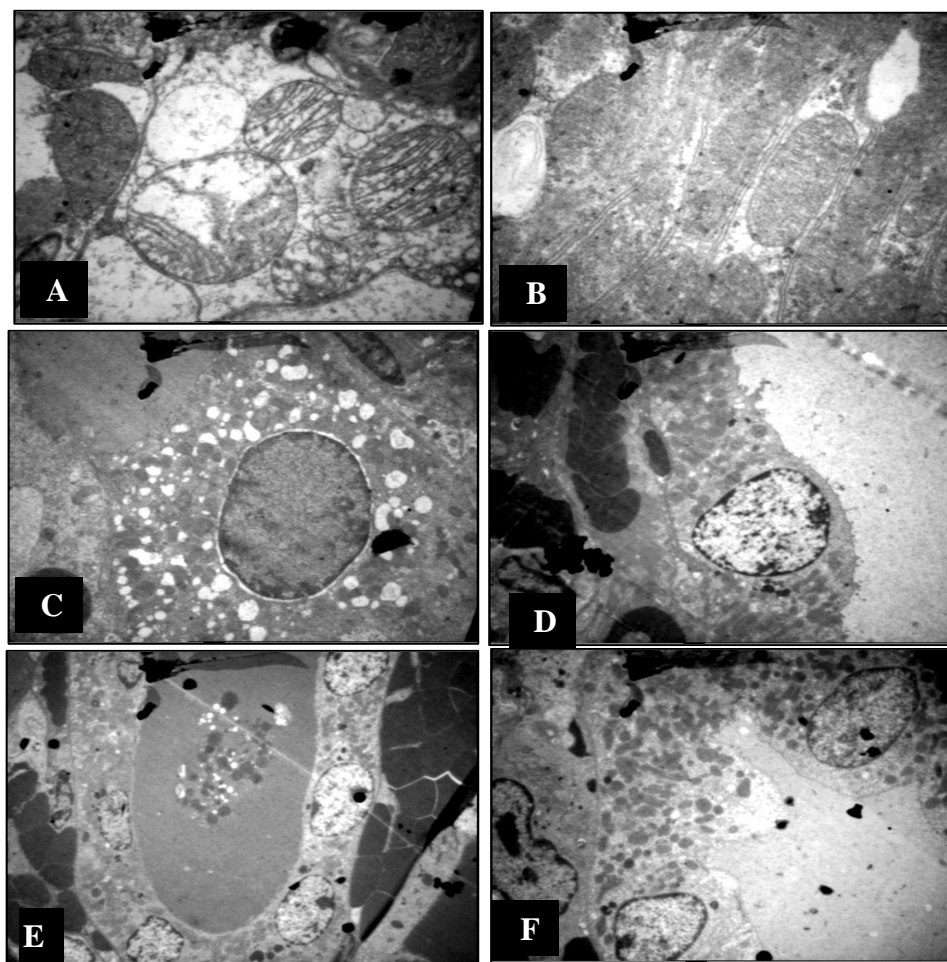
**جدول (۱):** تغییرات غلظت BUN و کراتینین پلاسما و فعالیت NAG در ادرار در طی ایسکمی پرفیوژن مجدد کلیه در حضور L-Nil (یک تزریق بولوس ۳ mg/kg/IV و انفوزیون آن به میزان ۱ mg/kg/h). تعداد نمونه‌ها در هر گروه پنج می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM گزارش شده است. ستاره، اختلاف معنی دار را نسبت به گروه کنترل در سطح  $p \leq 0.05$  نشان می‌دهد. # اختلاف معنی دار را نسبت به گروه IR در سطح  $p \leq 0.05$  نشان می‌دهد.

	Sham	IR	Sham+ L-Nil	IR+ L-Nil
BUN (mg/dl)	11.6 $\pm$ 1.74	71.2 $\pm$ 13.29*	11.8 $\pm$ 1.69	40.4 $\pm$ 4.97 *#
Creatinine (mg/dl)	0.49 $\pm$ 0.041	2.16 $\pm$ 0.07*	0.5 $\pm$ 0.038	1.39 $\pm$ 0.08 *#
NAG (U/l)	13.96 $\pm$ 2.16	78.12 $\pm$ 8.38*	15.17 $\pm$ 1.25	33.66 $\pm$ 2.30 *#

IR: ischemia/reperfusion; NAG: N-acetyl  $\beta$ -D glucosaminidase



**شکل (۱):** میزان دفع ادراری پروتئین‌ها در نمونه‌های ادراری (g/mmol creatinine) در طی ایسکمی پرفیوژن مجدد کلیه در حضور L-Nil (یک تزریق بولوس ۳ mg/kg/IV و انفوزیون آن به میزان ۱ mg/kg/h). تعداد نمونه‌ها در هر گروه پنج می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  SEM گزارش شده است. ستاره، اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه کنترل در سطح  $p \leq 0.05$  نشان می‌دهد. # اختلاف معنی‌دار را نسبت به گروه IR در سطح  $p \leq 0.05$  نشان می‌دهد.



شکل (۲): ساختار کلیه مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی پس از ۶ ساعت پرفیوژن مجدد.

(A) ساختار میتوکندری در گروه IR با بزرگنمایی ۶۰۰۰.

(B) ساختار میتوکندری در گروه L-Nil با بزرگنمایی ۱۲۹۳۰ (C) ساختار هسته در گروه IR با بزرگنمایی ۲۷۸۴.

(D) ساختار طبیعی هسته در گروه L-Nil با بزرگنمایی ۱۶۷۰ (E) یک توپول مسدود شده با سلولهای نکروز در گروه IR با بزرگنمایی ۱۰۰۰.

(F) ساختار توپولی در گروه L-Nil با بزرگنمایی ۱۶۷۰

## بحث

در این مطالعه ایسکمی و پرفیوژن مجدد به طور معنی داری باعث نفروتوکسیسیتی گردید که توسط افزایش در اوره و کراتینین سرم نشان داده شد. همچنین ایسکمی و پرفیوژن مجدد باعث افزایش فعالیت NAG شد که نشان دهنده ضایعات توپولی می باشد. آسیب حاد و مزمن در سلولهای توپولی باعث کاهش در میزان بازجذب این سلولها می شود (۳،۴). همچنین افزایش در میزان دفع آنزیم نیز وجود دارد چرا که از سلولهای آسیب دیده آزاد می شود (۱). بنابراین پروتئینهای با وزن ملکولی پایین به میزان

زیاد در ادرار دفع می شوند. در شرایط فیزیولوژیک این پروتئینها آزادانه از خلال دیواره مویرگهای گلومرولی فیلتر می شوند و اغلب به طور کامل توسط سلولهای توپول پروگزیمال باز جذب می شوند. در میان پروتئینهای با وزن ملکولی پایین عمدتاً  $\alpha_1$  - میکروگلوبولین به عنوان شاخصی از عملکرد توپولی استفاده می شود زیرا وقتی سلولهای توپول پروگزیمال آسیب می بینند بازجذب کاملی نخواهند داشت. در این مطالعه، ایسکمی و پرفیوژن مجدد کلیه باعث افزایش معنی داری در دفع پروتئینها، هم با وزن

۹۹ درصد آن در حالت طبیعی بازجذب می‌شود. بنابراین ضایعات توبولی حتی در غیاب ضایعات گلومرولی می‌توانند باعث افزایش در پروتئین اوری گردند (۱۶). و این بدان معنی است که اثر حفاظتی L-Nil می‌تواند مربوط به کاهش ضایعه توبولی و بهبود روند بازجذب باشد.

نتایج بافت شناسی نیز با نتایج عملکردی مطابقت دارد و نشان می‌دهد که L-Nil یک اثر حفاظتی بر ضایعات توبولی دارد. در این مطالعه بررسی با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که در گروه IR، از دست رفتن میکروویلی‌ها در سلول‌های توبول پروگزیمال، میتوکندری‌های آسیب دیده و تغییرات کف آلود در ساختار هسته و سیتوپلاسم وجود دارد اما درمان با L-Nil باعث کاهش ضایعات توبولی می‌شود. چون L-Nil اثری روی دفع ترانسفرین و IgG ندارد، پس بلوک NOS به طور ویژه باعث کاهش در پروتئین اوری توبولی می‌شود. این یافته‌ها همچنین مطرح می‌کند که احتمالاً در مکانیسم‌های نفروتوکسیسیته ایجاد شده توسط iNOS سلول‌های توبولی و گلومرولی تفاوت‌هایی وجود دارد. بنابراین در استراتژی‌های درمانی، باید نوع پروتئین اوری نیز مشخص شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که iNOS در پروتئین اوری توبولی ایجاد شده توسط IR نقش مهمی دارد.

## References:

1. Racusen LC. The morphologic basis of acute renal failure. In: Molitoris BA, Finn WF, Editors. Acute renal failure, a companion to Brenner and Rector's the kidney. Philadelphia: W.B Saunders; 2001.
2. Hossein-Nia M, Mellote GJ, Foxal P, Bending MR, Holt DW, et al. Urinary protein excretion and the diagnosis of graft rejection or renal dysfunction in renal transplant patients. Hum Exp Toxicol 1993; 12: 407-9.
3. Dyson EH, Will EJ, Davison AM, O'Malley AH, Shepherd HT, Jones RG. Use of the urinary protein creatinine index to assess proteinuria in renal transplant patients. Nephrol Dial Transplant 1992; 7: 450-2.
4. Reichel H, Zeier M, Ritz E. Proteinuria after renal transplantation: pathogenesis and management. Nephrol Dial Transplant 2004; 19: 301-5.

ملکولی پایین و هم با وزن ملکولی بالا گردید. و این بدان معنی است که اپی تلیوم توبولی و گلومرولی هر دو آسیب دیده‌اند. درمان با L-Nil به طور معنی داری باعث عدم افزایش در اوره و کراتینین سرم و یا فعالیت NAG نسبت به گروه IR شد و این نشانه بهبود عملکرد کلیه به خصوص عملکرد توبولی می‌باشد. این مطالعه، با مطالعه قبلی ما که اثرات حفاظتی L-Nil را در مقابل ضایعات IR نشان می‌داد مطابقت دارد (۵،۶).

Datta et al. نشان دادند که در گلومرونفریت، هم اکسیژناز ۱ باعث تضعیف بیان iNOS و پروتئین اوری می‌شود (۸). آنها نتیجه گیری نمودند که اثرات حفاظتی مشاهده شده بر پروتئین اوری مربوط به کاهش بیان iNOS است. همچنین Brooks et al. کاهش پروتئین اوری توسط آمینوگوانیدین (مهار کننده iNOS) را گزارش نمودند (۷). در این مطالعه L-Nil به طور معنی داری باعث کاهش در میزان دفع  $\alpha_1$  - میکروگلوبولین و آلبومین نسبت به IR می‌شود و این به معنی بهبود عملکرد توبولی است. در مورد آلبومین فرض بر این است که کاهش آلبومین در ادرار، نشانه کاهش نفوذ پذیری گلومرولی می‌باشد. ولی این نتایج نشان داد که L-Nil نتوانست به طور معنی داری باعث کاهش دفع ترانسفرین و IgG شود. سد فیلتراسیون گلومرولی باعث جلوگیری از فیلتراسیون میزان زیاد پروتئین می‌شود، اما این سد محدود است. به عنوان مثال میزان آلبومین فیلتر شده ۰.۷ الی ۳.۶ g/day می‌باشد که حدود ۹۶ الی

5. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA. Inhibition of inducible NO synthase reduces renal ischemia-reperfusion injury. Kid Int 2002; 61: 862-71.
6. Zahmatkesh M, Kadkhodae M, Arab HA, Shams S. Effects of co-administration of an iNOS inhibitor with a broad spectrum reactive species scavenger in rat renal ischemia/reperfusion injury. Nephron. Exp Nephrol 2006; 103: e119- 25.
7. Brooks DP, Contino LC. Involvement of nitric oxide synthase in proteinuria associated with chronic renal disease in rats. Pharmacol J 1998; 56: 257-61.
8. Datta PK, Koukouritaki SB, Hopp KA, Lianos EA. Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol 1997; 10: 2540-50.

9. Gunduz F, Kuru O, Senturk UK. Effect of nitric oxide on exercise induced proteinuria in rats. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1867-72.
10. Attia DM, Ni ZN, Boer P, Attia MA, Goldschmeding R. Proteinuria is preceded by decreased nitric oxide synthesis and prevented by a NO donor in cholesterol-fed rats. *Kid Int.* 2002; 61: 1776-87.
11. Gabbai FB. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. *Nephrol Dial Transplantat* 2001; 16: 10-3.
12. Hennessy A, Gillin AG, Duggin GG, Horuath JS, Tiller DJ. Low-dose nitro-L-arginine administration in Baboon (*Papio Hamadryas*) Pregnancy. *Clin Exp Pharm Physiol* 1999; 26: 849-52.
13. Lockwood TD, Bosmann HB. The use of urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase in human renal toxicity. I. Partial biochemical characterization and excretion in humans and release from the isolated perfused rat kidney. *Toxicol Appl Pharm* 1979; 49: 323-36.
14. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Molecul Biol* 1994; 32:9-15.
15. Gordon S, Tee RD, Taylor AJ. Analysis of rat urine proteins and allergens by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 298-305.
16. Giebisch G, Windhager E. Transport of urea, glucose and organic solutes. In: Boron WF, Boulpaep EL, Editors. *Medical Physiology*. Philadelphia: W.B Saunders; 2004.