

Research Article

Protective Effect of Nano Magnesium Oxide on Renal Ischemia/Reperfusion Injury on Renal Function and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Male Wistar Rats

Marzieh Minaei¹, Akram Eidi^{1*}, Pejman Mortazavi², Ahmad Asghari³

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Veterinary Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Department of Veterinary Clinical Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: akeidi@iau.ac.ir

Received: 15 January 2025

Accepted: 2 January 2024

DOI:

Abstract

Ischemia/reperfusion (I/R) injury is characterized by the restriction of blood supply to the organ followed by the return of blood flow and reoxygenation. The aim of this study was to measure Protective effect of nano magnesium oxide (MgO) on I/R on renal function and vascular endothelial growth factor (VEGF) in male Wistar rats. In this study, 54 adults male Wistar rats were randomly divided into 9 groups of 6 rats, including healthy control, control, I/R control, three healthy experimental groups, and three I/R experimental groups. I/R injury was induced by ligation of the left renal pedicle for 20 minutes. Animals were tested using MgO (doses of 1.25, 2.5 and 5 mg/kg) for 30 days via gavage and finally serum samples were collected to assess renal function. In addition, after sacrificing the animals, kidney tissue was obtained for immunohistochemical examination of VEGF expression and the resulting data were statistically analyzed ($p < 0.05$). The results showed that I/R mice that were intervened with MgO significantly reduced serum urea and creatinine levels at concentrations of 2.5 and 5 mg/kg. Renal function and VEGF expression also showed significant improvement. MgO, as a potent vasodilator, were able to improve serum urea and creatinine levels as indicators of renal cell damage in I/R groups. Also, by reducing the expression level of VEGF in MgO-treated groups, MgO may effectively mediate the protection against hypoxia induced by I/R injury.

Keywords: Nano magnesium oxide, Ischemia/reperfusion, Kidney, VEGF.



مقاله پژوهشی

اثر محافظتی نانو اکسید منیزیم در آسیب ایسکمی/پرپیوژن کلیه بر عملکرد کلیه و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر

مرضیه مینایی^۱، اکرم عیدی^{۱*}، پژمان مرتضوی^۲، احمد اصغری^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه پاتولوژی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: akeidi@iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۶

DOI:

چکیده

آسیب ایسکمی/پرپیوژن مجدد (I/R) با محدود شدن خون‌رسانی به اندام و به دنبال آن بازگشت جریان خون و اکسیژن‌رسانی مجدد مشخص می‌شود. هدف از این مطالعه، سنجش اثر محافظتی نانو اکسید منیزیم (MgO) در آسیب ایسکمی/پرپیوژن کلیه بر عملکرد کلیوی و فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در موش صحرایی نر می‌باشد. در این مطالعه ۵۴ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی شامل گروه‌های کنترل سالم، شاهد، کنترل I/R، سه گروه تجربی سالم و سه گروه تجربی I/R تقسیم شدند. القای آسیب I/R از طریق بستن پدیكل کلیوی چپ به مدت ۲۰ دقیقه ایجاد شد. حیوانات با استفاده از MgO (دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به مدت ۳۰ روز از طریق گاوژ مورد آزمایش قرار گرفتند و در نهایت نمونه‌های سرم برای بررسی عملکرد کلیه جمع‌آوری شد. به علاوه با قربانی شدن حیوانات، بافت کلیه برای بررسی ایمونوهیستوشیمی میزان بیان VEGF اخذ شد و داده‌های حاصل مورد آنالیز آماری قرار گرفت ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که موش‌های I/R که با نانو اکسید منیزیم مداخله شدند، در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم سطوح اوره و کراتینین سرم را به طور معنی‌داری کاهش دادند. همچنین عملکرد کلیوی و بیان VEGF، بهبود معنی‌داری نشان داد. MgO توانسته به عنوان یک وازودیلاتور قوی، سطوح اوره و کراتینین سرم را به عنوان شاخص‌های آسیب سلول‌های کلیوی، در گروه‌های I/R بهبود بخشد. همچنین با کاهش سطح بیان VEGF در گروه‌های تحت درمان MgO، ممکن است نانو اکسید منیزیم برای محافظت از هیپوکسی ناشی از آسیب I/R به طور مؤثری واسطه شود.

کلمات کلیدی: نانو اکسید منیزیم، ایسکمی/پرپیوژن، کلیه، VEGF.

مقدمه

NPs برای کاربردهای بیولوژیکی باید به گونه‌ای ساخته شوند که وقتی روی سلول‌ها، بافت‌ها یا سرم اعمال می‌شوند، ویژگی‌های مطلوبی داشته باشند (۲). از آنجایی که NPs نسبت سطح به حجم بیشتری

حوزه نانوپزشکی به سرعت در حال پیشرفت و گسترش است. ذرات بسیار ریزی که دارای اندازه بیشتر از ۱ نانومتر و کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر باشد، نانوذرات (Nanoparticles, NPs) نامیده می‌شوند (۱).

نسبت به ذرات بزرگتر دارند، تأثیر بیشتری بر محیط دارند و با مواد دیگر به شدت تعامل می‌کنند (۳). NPs قابلیت مصرف بهتر، پایداری کلئیدی در محیط‌های بیولوژیکی، راندمان درونی سازی بالا و سمیت کمتری نسبت به میکروذرات نشان می‌دهند. نفوذپذیری سلولی بالاتر و اثرات کوانتومی بیشتر به عنوان تابعی از اندازه نانوذرات، دلیل منحصر به فرد بودن آنهاست (۴). مهم‌ترین ویژگی این داروها، اندازه ذرات، وزن مولکولی، pH، قدرت یونی، غلظت مونومر و بار سطحی می‌باشد (۵). منیزیم (Mg) کاتیون و ماده معدنی مهم درون سلولی در سلول‌های بدن انسان است (۶) همچنین یک عنصر مهم برای حفظ عملکرد طبیعی تقریباً سیصد آنزیم سلولی بدن می‌باشد (۷). در میان نانومواد اکسید فلزی، نانو اکسید منیزیم (MgO) به عنوان ماده‌ای کم‌هزینه و سازگار با محیط زیست در نظر گرفته شده است. سمیت MgO کمتر از سایر نانوذرات اکسیدی فلزی می‌باشد (۶). نانوذرات MgO اثرات مفیدی در سلول‌ها نشان می‌دهند (۸، ۹). نمک‌های منیزیم حاوی MgO به عنوان مکمل منیزیم درمانی می‌تواند باعث افزایش غلظت منیزیم کبدی، افزایش بیان mRNA ی کاتالاز و در نتیجه افزایش فعالیت کاتالاز گردد (۱۰). اکسید منیزیم فراهمی‌زیستی نسبتاً ضعیفی دارد (۱۱) و دست‌کاری مشخصه‌های فیزیکوشیمیایی ذرات MgO به فرم نانو می‌تواند فراهمی‌زیستی آن را افزایش دهد (۱۲). در ارزیابی اثر ضد تشنج در موش گزارش شده است که نانوذرات اکسید منیزیم مؤثرتر از شکل معمول آن بوده است که مربوط به خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانو MgO می‌باشد (۱۳). مکانیسم اصلی عملکرد نانوذرات، هنوز شناخته نشده است. با این وجود، با توجه به ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانومواد، پیش‌بینی می‌شود که این مواد با اجزای زیستی برهمکنش داشته باشند و اثرات زیادی بر رفتار

و خصوصیات ماکرومولکول، سلول و بدن موجود زنده به جای بگذارند (۱۴). علاوه بر این، گزارش شده است که آن‌ها شاخص‌های استرس اکسیداتیو نظیر گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر را کاهش داده و باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها نیز می‌شوند (۱۵). آن‌ها سمیت ژنی قابل‌توجهی نشان ندادند که کاربردهای بالقوه آن‌ها را در داروهای نانو به عنوان یک ابزار تشخیصی و درمانی نشان می‌دهد (۹). آسیب ایسکمی رپرفیوژن Ischemia-Reperfusion Injury/ IRI) کلیوی، کاهش جریان خون قشری است که باعث هیپوپرفیوژن بافتی شده و می‌تواند در اثر بیماری‌هایی مانند سپسیس، افت فشار خون، تنگی شریان کلیوی پس از نفرکتومی جزئی و یا در حین پیوند کلیه ایجاد شود. پس از ایسکمی کلیوی، جریان خون کلیه به حالت عادی باز می‌گردد، اما تغییرات ناحیه ای رخ می‌دهد. ناحیه مدولاری بیرونی در شرایط عادی به‌طور حاشیه‌ای اکسیژنه می‌شود و به ویژه شاخه ضخیم صعودی توبول کلیوی، نیازهای انرژی بالایی دارد (۱۶، ۱۷). جریان خون در این ناحیه پس از خون‌رسانی مجدد به حدود ۱۰ درصد طبیعی می‌رسد که منجر به ادم، جریان خون ضعیف، محرومیت از مواد مغذی و از دست دادن ATP می‌شود (۱۸). محصولات تخریب ATP مانند هیپوگزانتین می‌توانند از سلول‌ها نشت کنند و توسط گزانتین اکسیداز به اسید اوریک تبدیل می‌شود. در این فرآیند گونه‌های اکسیژن فعال تشکیل شده که منجر به آسیب ایسکمیک گردیده و تداوم بیشتر ایسکمی و آسیب سلولی توبولی را منجر می‌شود. تورم سلول‌های توبولی در فضای محدود مدولای خارجی به‌طور مکانیکی به انسداد مویرگی می‌افزاید و باعث کاهش جریان خون مدولاری و تداوم بیشتر ایسکمی و آسیب سلولی توبولار می‌شود (۲). بیماری حاد کلیوی مرتبط با I/R، یک مشکل بالینی شایع با مرگ

نشان‌دهنده‌ی میزان فیلتراسیون گلوبرولی است (۳۲)، از این رو اندازه‌گیری آن‌ها به عنوان مارکرهای بیوشیمیایی برای ارزیابی عملکرد کلیه (۳۳)، می‌تواند معیار مهمی در بررسی‌های I/R کلیه به حساب آید.

مواد و روش‌ها

نانوذره اکسید منیزیم کروی با درجه خلوص ۹۹ درصد و اندازه ۶۰-۲۰ نانومتر از شرکت پیشگامان خریداری گردید و از آب مقطر برای حل شدن نانوذرات MgO استفاده شد. کیت اندازه‌گیری اوره و کراتینین سرم از شرکت پارس آزمون (ایران) و کیت ایمونوهیستوشیمی (IHC) VEGF از شرکت Dako، United States and Canada، تهیه گردید.

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه بر روی ۵۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم انجام شد. حیوانات از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند و تحت شرایط استاندارد در قفس‌های پلی‌کربنات در دمای محیط 22 ± 2 سانتی‌گراد با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. تمامی آزمایشات بر روی حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های کمیته اخلاق حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات با شناسه کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1398.136 انجام گردید.

روش جراحی: به منظور ایجاد ایسکمی رپرفیوژن، حیوانات توسط کتامین هیدروکلراید (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) با تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند (۷، ۳۴). جهت ایجاد ایسکمی رپرفیوژن، خط میانی شکم برش داده شد و عروق کلیوی توسط پنس غیر ضربه‌ای (Non-traumatic) بسته شده و بعد از ۲۰ دقیقه آزاد گردیدند. جهت مرطوب نگاه داشتن ناحیه، از تامپون

و میر و عوارض بالاست (۱۹، ۲۰). علاوه بر این، پاتوژنز I/R کلیه ممکن است در ارتباط با مکانیسم‌هایی از جمله اختلال عملکرد اندوتلیال، پاسخ‌های التهابی سیستمیک و موضعی، استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و نکروز باشد (۲۱، ۲۲). با این‌حال، علت و مکانیسم دقیق I/R کلیه هنوز نامشخص است. فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) میتوژن اختصاصی سلول اندوتلیال و یک پروتئین دایمری مخفی است که به روش‌های مختلف می‌تواند رگ‌زایی را القا کند (۲۳، ۲۴). رگ‌زایی در بسیاری از شرایط پاتولوژیک همچون رشد تومور، متاستاز، نفروپاتی دیابتی، دژنراسیون ماکولا، آرتریت روماتوئید و پسوریازیس نقش کلیدی ایفا می‌کند (۲۵، ۲۶). همچنین با تومور کلیه و بیماری کلیه پلی‌کیستیک نیز مرتبط است (۵). از بین تمام مولکول‌های شناخته شده رگ‌زایی، VEGF احتمالاً فاکتور رشد رگ‌زایی اولیه و بهترین تعدیل‌کننده در الگوسازی عروق است که مسئول تمایز آنژیوبلاست و تشکیل لوله است و فعالیت بیولوژیک خود را از طریق اتصال به دو گیرنده تیروزین‌کینازی به نام گیرنده‌های Flt-1 (VEGFR₁) و KDR (VEGFR₂) اعمال می‌کند (۲۷، ۲۸). علاوه بر این، نقش VEGF در رگ‌زایی برای ایجاد ایسکمی خون‌رسانی مجدد بافت و همچنین برای تشکیل تومور بسیار مهم است (۲۹، ۳۰، ۳۱). هیپوکسی یک تنظیم‌کننده کلیدی بیان ژن VEGF است. علاوه بر هیپوکسی، بسیاری از سیتوکین‌ها، هورمون‌ها و فاکتورهای رشد می‌توانند بیان mRNA VEGF را در انواع مختلف سلول تنظیم کنند (۵). در این مطالعه، از یک مدل I/R کلیوی برای بررسی اثر MgO در بیان سیتوکین‌های محافظ از جمله VEGF در کلیه ایسکمیک موش صحرایی استفاده شده است. با توجه به این‌که مقدار سرمی کراتینین و اوره

خیس شده با نرمال سالین گرم استفاده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، آن‌ها را برداشته و خط میانی شکم طبق روش‌های متداول (عضلات با نخ ویکریل ۰۳ و پوست با نخ نایلون ۰۳) بخیه گردید (۷، ۳۵).

گروه‌های مورد مطالعه: مطالعات در تمام گروه‌ها طی زمان‌های یکسان به‌عمل آمد. موش‌ها به صورت تصادفی به ۹ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل سالم): حیوانات دست نخورده، همراه با گاوآز آب مقطر، گروه ۲ (شاهد): حیوانات تحت جراحی sham، همراه با گاوآز آب مقطر، گروه‌های ۳-۵ (تجربی سالم): حیوانات سالم با تیمار نانوآکسیدمینیزیم ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بصورت گاوآز روزانه (۳۶، ۳۷)، گروه ۶ (کنترل I/R): حیوانات تحت جراحی ایسکمی/رپرفیوژن همراه با گاوآز آب مقطر و گروه‌های ۷-۹ (تجربی I/R): حیوانات تحت جراحی ایسکمی/رپرفیوژن با تیمار نانوآکسیدمینیزیم ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم بصورت گاوآز روزانه.

آزمایشات سرولوژیک: ۳۰ روز پس از گاوآز نانوآکسیدمینیزیم با ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم (۱۲، ۳۶)، خون از قلب حیوانات جمع‌آوری شد. سرم تهیه شده و سطوح نیتروژن اوره سرم (BUN) و کراتینین سرم (Scr) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (ایران) اندازه‌گیری شد (۳۸).

ارزیابی ایمونوهیستوشیمی: پس از شکافتن حفره شکمی بافت کلیه به دقت جدا و برای فیکساسیون کلیه‌ها در فرمالین بافر شده با فسفات (۱۰ درصد) نگهداری شدند. سپس مراحل پاساژ بافتی، تهیه بلوک‌های پارافینی، تهیه برش‌های ۳ میکرونی و مرحله رنگ‌آمیزی به روش ایمونوهیستوشیمی (Immunohistochemistry, IHC) دقیقاً مطابق روش انجام آزمایش که در بروشور کیت توصیه شده بود، رفتار شد و به ترتیب زیر انجام شد. نمونه‌ها را درون

اتوکلاو ۱۰۰ درجه، سپس درون بافر سیترات ۰/۰۲ مولار با $\text{pH} = 6$ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده سپس خارج کرده و درون بافر P.B.S با $\text{pH} = 7.4$ به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم و سپس اطراف نمونه را کاملاً خشک کرده، در مرحله‌ی بعد پروتئین بلاک را به مدت ۵ دقیقه بر روی لام‌ها ریخته و مجدداً در دو ظرف P.B.S آن‌را شستشو داده، بعد از این مرحله ابتدا لام‌ها را از داخل P.B.S برداشته کاملاً خشک می‌کنیم و آنتی‌بادی رقیق شده یک دوم را به مدت یک ساعت اضافه کردیم، سپس لام‌ها را مجدداً در P.B.S قرار می‌دهیم، خشک می‌کنیم و لام‌ها را در P.B.S قرار داده، خشک می‌کنیم و محلول Novolink.polymer به مدت ۳۰ دقیقه اضافه کرده، مجدداً در P.B.S قرار می‌دهیم و لام‌ها را تمیز نموده و بعد DAB را به مدت ۱۰ دقیقه روی سطح نمونه می‌ریزیم. سپس به مدت ۸ دقیقه مستقیماً وارد هماتوکسیلین کردیم و به ترتیب وارد آب جاری، اسید الکل ضعیف، آب جاری، کربنات لیتیم ۱ درصد و آب جاری کردیم. مرحله‌ی آبگیری با الکل‌های صعودی ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ هرکدام به مدت ۲ دقیقه و با گزیل ۱ و ۲ لام‌ها را شفاف نموده و بعد با چسب مونته می‌کنیم.

بررسی میزان واکنش‌پذیری VEGF در نمونه‌ها: اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده و نتایج از طریق میکروسکوپ نوری (Olympus، آلمان) تفسیر شد. بر این اساس، در هر لام به طور تصادفی در زیر میکروسکوپ، ده میدان انتخاب و ۱۰۰ سلول اپیتلیال توبول با بزرگنمایی $\times 400$ محاسبه شد و نسبت هسته‌ای ایمونوراکتیو به‌دست آمد و در انتها درصد هسته‌های رنگ‌گرفته در بین ۱۰۰۰ سلول اپیتلیال مشخص شد. ایمونوراکتیویته زیر ۵ درصد منفی و بالای ۵ درصد مثبت قلمداد گردید. کنترل منفی، رنگ‌آمیزی اسلایدها بدون آنتی‌بادی ثانویه بود. میزان

ایمونو واکنش پذیری هسته‌ای به صورت درصد تعریف شد. به‌طوری‌که، بین ۵ تا ۳۰ درصد = ۱، ۳۰ تا ۶۵ درصد = ۲ و بالای ۶۵ درصد = ۳ ارزیابی شد (۳۹، ۴۰).

تجزیه و تحلیل آماری: از نرم‌افزار SPSS ۲۱، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. اختلاف در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سطح کراتینین و اوره سرم افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) در موش‌های کنترل I/R در مقایسه با کنترل سالم نشان داد. تیمار نانو اکسید منیزیم در دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار ($p < 0.001$) در غلظت‌های کراتینین و اوره در موش‌های I/R نسبت به موش‌های کنترل I/R شد. تیمار نانو اکسید منیزیم (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) تغییری در غلظت کراتینین و اوره سرم در موش‌های سالم ایجاد نکرد (جدول ۱). نتایج حاصل از تکنیک ایمونوهیستوشیمی در مورد تغییرات بیان ژن VEGF در بافت کلیه نشان داد که در گروه کنترل سالم، گروه شاهد جراحی،

گروه‌های سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، ساختار کلیوی طبیعی همراه با گلومرول‌های طبیعی است و بیان خفیف VEGF در گلومرول‌ها و لوله‌های کلیوی مشاهده گردید. در صورتی‌که موش‌های صحرایی گروه کنترل ایسکمی/ریپرفیوژن با بیان شدید VEGF در لوله‌های کلیوی مشاهده شدند، همچنین گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF را در لوله‌های کلیوی نشان دادند (شکل ۱). در بررسی میزان ایمونو واکنش پذیری هسته‌ای به صورت درصد نیز شدت بروز نشانگر VEGF در گروه‌های کنترل سالم و سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم VEGF امتیاز ۱ درصد (بیان خفیف) را دریافت کردند. در صورتی‌که گروه کنترل I/R امتیاز ۳ درصدی (بیان شدید VEGF) و گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم امتیاز ۲ درصدی (بیان متوسط تا خفیف VEGF) را نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۱- اثر نانو اکسید منیزیم بر سطوح اوره و کراتینین سرمی در موش‌های سالم و I/R

Table 1. Effect of nano-MgO on levels of Serum Urea and Creatinine in normal and I/R rats

Group	Urea (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Normal Control	14.83 ± 0.48	0.67 ± 0.17
Sham-operated	14.48 ± 0.52	0.68 ± 0.02
Normal Experimental + Nano-MgO (mg/kg)		
1.25	14.50 ± 0.43	0.68 ± 0.01
2.5	14.50 ± 0.56	0.69 ± 0.01
5	15.33 ± 0.42	0.70 ± 0.01
I/R Control	70.83 ± 2.33 ***	2.91 ± 0.05 ***
I/R Experimental + Nano-MgO (mg/kg)		
1.25	68.01 ± 1.29 ***	2.68 ± 0.91 ***
2.5	62.33 ± 1.54 ***+++	2.52 ± 0.91 ***+++
5	46.50 ± 1.18 ***+++	1.83 ± 0.63 ***+++

مقادیر بعنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار برای شش موش بیان می‌شوند. *** $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل سالم و +++ $p < 0.001$

$p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل I/R

Values are expressed as mean $\pm$ SEM for six rats. *** $p < 0.001$ significantly different from the normal control group and +++ $p < 0.001$ significantly different from the I/R control group.

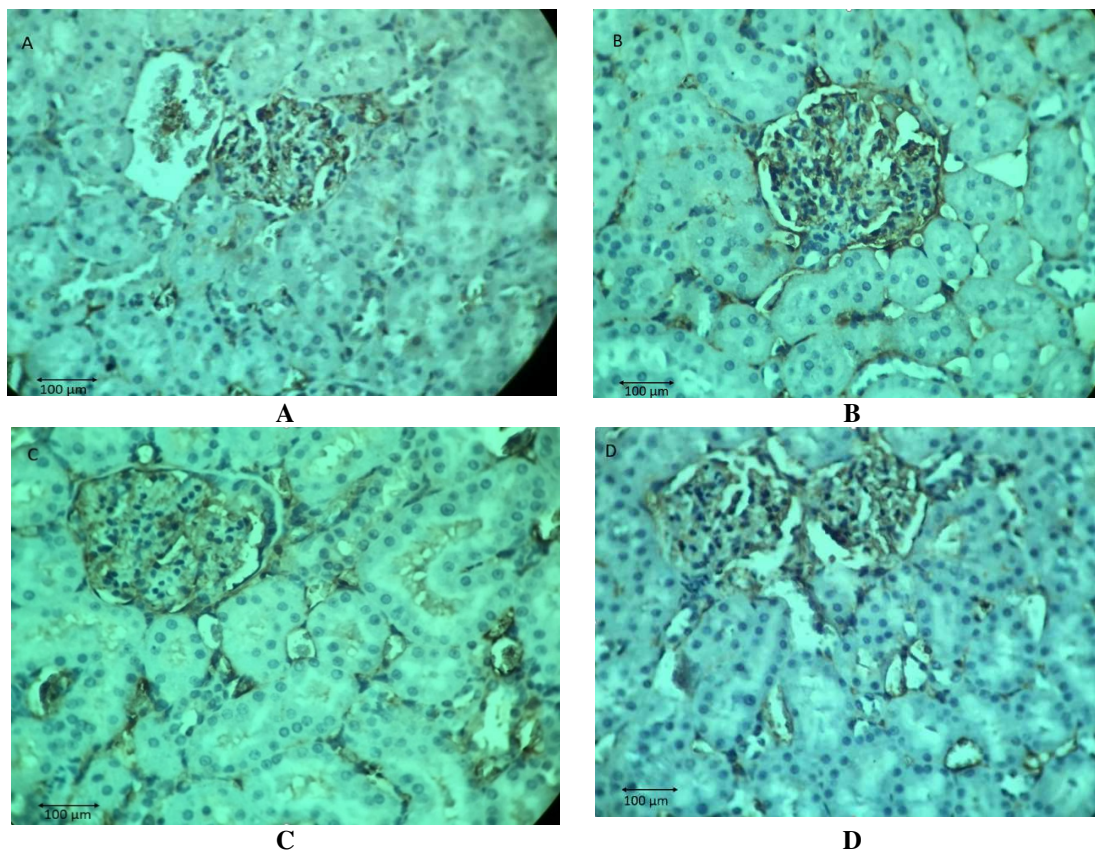
جدول ۲- اثر نانو MgO بر میزان ایمونواکنش‌پذیری هسته‌ای VEGF در بافت کلیه موش‌های صحرایی سالم و I/R

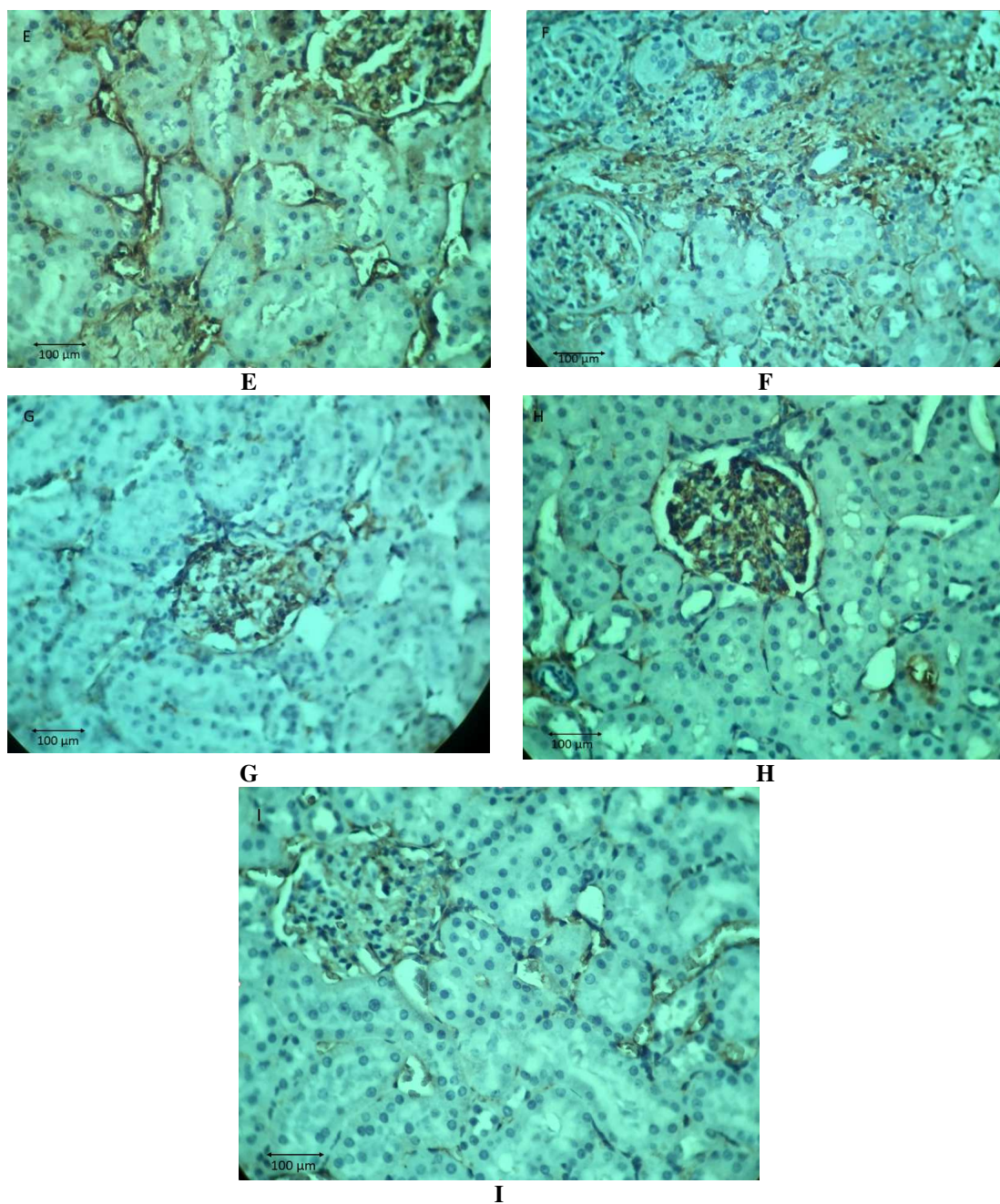
Table 2. Effect of nano-MgO on VEGF expression levels in normal and I/R rats

Group	VEGF Expression rate
Normal Control	1.0 ± 0.00
Sham-operated	1.0 ± 0.00
Normal Experimental + Nano-MgO (mg/kg)	
1.25	1 ± 0
2.5	1 ± 0
5	1 ± 0
I/R Control	3 ± 0.2 ***
I/R Experimental + Nano-MgO (mg/kg)	
1.25	2.6 ± 0.2 ***
2.5	1.8 ± 0.4 **+++
5	1.4 ± 0.3 +++

مقادیر به‌عنوان میانگین $\pm$ انحراف معیار برای شش موش بیان می‌شوند. $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.001$ +++ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل نرمال و ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ اختلاف معنی‌دار از گروه کنترل I/R.

Values are expressed as mean $\pm$ SEM for six rats. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significantly different from the normal control group and ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ significantly different from the I/R control group.





شکل ۱. بیان VEGF در بافت کلیه در تمام گروه‌های مختلف مطالعه. A: گروه کنترل سالم، B: گروه شاهد جراحی، C-E: گروه‌های سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با ساختار کلیوی طبیعی با گلومرول‌های طبیعی و بیان خفیف VEGF در گلومرول‌ها و لوله‌های کلیوی؛ F: موش‌های صحرایی کنترل ایسکمی/ریپرفیوژن (I/R) با بیان شدید VEGF لوله‌های کلیوی، G-I: گروه‌های تجربی I/R دریافت‌کننده نانو MgO (۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) با بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی (IHC). 400×

Fig. 1. VEGF expression in renal tissue in all experimental groups. A, normal control group; B sham-operated group; C-E experimental normal groups receiving nano- MgO (1.25, 2.5, and 5 mg/kg) with normal renal structure with normal glomeruli and mild expression of VEGF in glomeruli and renal tubules; F, ischemia/reperfusion (I/R) control rats with a severe expression of VEGF in renal tubules; G-I experimental I/R groups receiving nano- MgO (1.25, 2.5, and 5 mg/kg) with moderate to a mild expression of VEGF in renal tubules (IHC). 400x

بحث

آسیب ایسکمیک رپرفیوژن کلیه یک فرآیند پاتوفیزیولوژیک پیچیده است (۴۱، ۴۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۲۰ دقیقه ایسکمی و به دنبال آن، بازخونسازی موجب اختلال در عملکرد کلیوی می‌شود. تیمار خوراکی نانوآکسیدمنیزیم موش‌های صحرایی به مدت ۳۰ روز می‌تواند فعالیت کلیوی را بهبود بخشد. میزان کراتینین و اوره در سرم گروه کنترل ایسکمیک رپرفیوژن به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل سالم بود که نشان‌دهنده نوعی آسیب به کلیه و تغییر عملکرد کلیه است. از طرف دیگر تیمار نانوآکسیدمنیزیم توانست کاهش معنی‌داری ($p < 0/001$) در میزان اوره و کراتینین سرم ایجاد کند. اوره آخرین محصول ایجاد شده از متابولیسم اسیدهای آمینه و کاهش پروتئین‌ها است و افزایش مقدار کراتینین در پلاسما گویای کاهش تصفیه گلومرولی و اختلال در عملکرد کلیه است (۴۳) و شاخص‌های شناخته شده‌ای برای نظارت بر عملکرد کلیه (۴۴) و عملکرد صحیح مویرگ‌های گلومرولی و آسیب‌های کپسول بومن هستند (۴۵). نانوآکسیدمنیزیم به‌صورت معنی‌داری سطح کراتینین و اوره را در موش‌های I/R نسبت به موش‌های کنترل I/R کاهش می‌دهد که احتمالاً به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و تعدیل سیستم‌ایمنی است (۴۶). در پژوهش پان‌دیر و همکاران (۲۰۱۳) نیز سطوح اوره و کراتینین سرم در موش‌های صحرایی با مدل ایسکمیک ۴۰ دقیقه‌ای، افزایش معنی‌داری ($p < 0/005$) ایجاد کرده است (۴۷). همان‌گونه که در مطالعه‌ی شی و همکاران (۲۰۱۰) نیز I/R در کلیه منجر به بالا رفتن غلظت‌های پلاسمایی کراتینین و اوره نسبت به گروه شاهد گردیده بود (۴۸). مکانیسم‌های نهفته در I/R کلیه‌ها احتمالاً چند فاکتوری و وابسته به یکدیگرند و شامل هیپوکسی، آسیب استرس‌اکسیداتیو و پاسخ‌های التهابی

می‌باشند (۴۹). در پژوهش حاضر در گروه‌های I/R نیز با القاء آپوپتوز و آسیب به بافت کلیه، افزایش فاکتورهای بیوشیمیایی کلیه مانند کراتینین و اوره سرم مشاهده شد. استرس‌اکسیداتیو سبب آسیب گلومرولی شده و افزایش اوره و کراتینین به دنبال القای I/R نشان‌دهنده ایجاد آسیب گلومرولی است (۵۰). ایسکمیک رپرفیوژن باعث افزایش سطح اوره خون می‌شود که به دلیل افزایش کاتابولیسم پروتئین و خروج گروه آمین از اسیدهای آمینه ایجاد می‌شود. تجزیه پورین‌ها یا ناتوانی کلیه در از بین بردن آن‌ها هر دو به افزایش اسید اوریک کمک می‌کنند. فیلتراسیون غیرطبیعی ذرات توسط کلیه با افزایش کراتینین در سرم خون مرتبط است (۵۱) و MgO توانسته به‌صورت موفق در کاهش میزان اوره و کراتینین سرم در گروه‌های تجربی ایسکمیک دریافت‌کننده دوزهای ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت معنی‌دار ($p < 0/001$) عمل کند. این نتایج با آنچه توسط نات در سال ۲۰۰۰ گزارش شده بود مطابقت داشت که نشان داد پیش‌درمانی با استفاده از منیزیم منجر به کاهش قابل‌توجهی در عملکرد کلیوی حیوانات آزمایشگاهی می‌شود و باعث ایجاد برخی تغییرات در کراتینین و کلیرانس کراتینین سرم می‌شود (۵۲). همچنین با آنچه توسط ژائو و همکارانش (۲۰۱۷) یافت شد، که تأیید کرد منیزیم با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور قابل‌توجهی I/R را مهار می‌کند. سطوح BUN و Cr ناشی از القای I/R را در موش I/R مجدداً بهبود می‌بخشد، مطابقت دارد. (۵۳). به دلیل نقش کلیدی رگ‌زایی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، کنترل این پدیده در روش‌های درمانی بسیار حائز اهمیت است. رگ‌زایی پاتولوژیک در رشد تومور، متاستاز، بیماری‌های ایسکمیک، رتینوپاتی دیابتی، دژنراسیون ماکولا، آرتریت روماتوئید و

پسوریازیس رخ می‌دهد (۲۶، ۵۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گروه‌های کنترل سالم، شاهد جراحی و سالم تجربی دریافت‌کننده نانو MgO با دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیان خفیف VEGF در گلوامرول‌ها و لوله‌های کلیوی را نشان دادند در حالی‌که گروه‌های تجربی ایسکمی دریافت‌کننده نانو MgO به‌ترتیب در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی را نشان دادند و باعث بهبود عملکرد کلیوی گردید ولی در گروه کنترل ایسکمی، بیان شدید VEGF در بافت کلیه مشاهده گردید. فاکتورهای رشد متعددی در القاء پدیده رگ‌زایی نقش ایفا می‌کنند که مهمترین و کلیدی‌ترین آن‌ها VEGF است (۳۰). بیان این پروتئین همودایمر در تمامی شرایط پاتولوژیک نام‌برده به‌شدت افزایش می‌یابد (۵۴). با توجه به نقش اساسی VEGF به‌عنوان حیاتی‌ترین فاکتور دخیل در پدیده رگ‌زایی، این مولکول در زمره اهداف درمانی کلیدی قرار گرفته و مطالعات بسیاری در زمینه مهار آن انجام شده است. برخی مطالعات نشان دادند که VEGF در افراد I/R در مقایسه با افراد سالم بالاتر بود و I/R با افزایش سطوح VEGF بدون توجه به عوامل مخدوش‌کننده، مرتبط بود که به‌دلیل هیپوکسی رخ داده در ایسکمی، توجیه‌پذیر است (۵۵، ۵۶). سطح بیان بالای VEGF را می‌توان با هیپوکسی از طریق فاکتور القا کننده هیپوکسی توجیه کرد (۵۷). بنابراین، VEGF ممکن است نقش مهمی در تشدید I/R حاد کلیه، ارتقاء تکثیر سلولی و ژيوژنز داشته باشد و این مکانیسم‌ها را می‌توان به ورود به سلول‌های آسیب دیده و اثرات پاراکرین VEGF نسبت داد (۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱). VEGF به‌عنوان یک میتوژن مهم رگ‌زایی، می‌تواند رگ‌زایی را تحریک کرده و تراکم مویرگی بافت را بهبود بخشد (۶۲). هیپوکسی عمده بیان VEGF را

تنظیم می‌کند. Rajnoch و همکاران (۲۰۰۵) یک واگرایی در بیان mRNA VEGF و پروتئین VEGF پس از ایسکمی نشان دادند (۶۳). نتایج مطالعه‌ی Zhou و همکاران در سال ۲۰۲۴ نشان داد که KIT-PR1P/VEGF می‌تواند به‌طور خاص کلیه ایسکمیک را هدف قرار دهد و VEGF بیشتری را در بافت کلیه پس از I/R ذخیره کند. علاوه‌بر این، رگ‌زایی را به‌شدت افزایش داد (۶۴). نتایج این مطالعه نشان داد که گروه کنترل ایسکمی، VEGF بسیار بیشتری را در بافت کلیه پس از I/R بیان می‌کند. بنابراین VEGF ممکن است نقش مهمی در تشدید I/R حاد کلیه در گروه کنترل ایسکمی داشته باشد، که احتمالاً به‌دلیل هیپوکسی ایجادشده در ایسکمی رخ داده است. سپس اثر حفاظتی نانواکسید منیزیم بر کلیه ایسکمیک به روش ایمونوهیستوشیمی بررسی گردید و گروه‌های تجربی ایسکمی دریافت‌کننده نانو MgO به‌ترتیب در دوزهای ۱/۲۵، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیان متوسط تا خفیف VEGF در لوله‌های کلیوی را نشان دادند و باعث بهبود عملکرد کلیوی گردید که احتمالاً نانواکسید منیزیم توانسته است به‌طور مؤثر عمل کند.

نتیجه‌گیری

نانواکسید منیزیم به‌صورت معنی‌داری اختلال عملکرد کلیه را از طریق کاهش سطوح اوره و کراتینین سرم و میزان بیان VEGF در گروه‌های درمان شده ایسکمی پرفیوژن مجدد کلیه چپ، بهبود می‌بخشد. بنابراین، نانو MgO به‌عنوان یک عامل محافظ قوی در پاسخ به آسیب‌های I/R کلیوی در موش‌ها احتمالاً عمل می‌کند و می‌تواند عملکرد کلیه را در برابر I/R محافظت نماید.

منابع

1. Neuwelt EA, Hamilton BE, Varallyay CG, Rooney WR, Edelman RD, Jacobs PM,

- Physiol. Renal Physiol. 2017;313(2):339-350.
9. Kumaran RS, Choi YK, Singh V, Song HJ, Song KG, Kim KJ, Kim HJ. In vitro cytotoxic evaluation of MgO nanoparticles and their effect on the expression of ROS genes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16(4):7551-7564.
10. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *J. Inorg. Biochem.* 2009;130(1):41-50.
11. Jahangiri L, Kesmati M, Najafzadeh H. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory effect of nanoparticles of magnesium oxide in mice with and without ketamine. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013;17(20):2706-2710.
12. Kellum JA, Unruh M.L, Murugan R. Acute kidney injury. *BMJ clinical evidence*, Published online 2011 Mar 28.
13. Jin T, He Y. Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens. *J. Nanopart. Res.* 2011;13(12):6877-6885.
14. Revell PA. The biological effects of nanoparticles. *Nanotechnol. Percept.* 2006; 2(1):283-298.
15. Sinha MK. Role of 'Ischemia-modified albumin', a new biochemical marker of myocardial ischemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg. Med.* 2004; 21(1):29-34.
16. Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney int.* 1993;43(5): 1160-1178.
17. Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003;284(4):608-627.
18. Vetterlein F, Bludau J, Petho-Schramm A, Schmidt G. Reconstruction of blood flow distribution in the rat kidney during postischemic renal failure. *Nephron.* 1994;66(2):208-214.
- Watnick SG. Ultrasmall superparamagnetic iron oxides (USPIOs): a future alternative magnetic resonance (MR) contrast agent for patients at risk for nephrogenic systemic fibrosis (NSF)?. *Kidney Int.* 2009;75(5): 465-474.
2. Brede CH, Labhasetwar V. Applications of Nanoparticles in the Detection and Treatment of Kidney Diseases. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013;20(6):454-465.
3. Badawy MM, Sayed-Ahmed MZ, Almoshari Y, Alqahtani SS, Alshahrani S, Mabrouk HAA, Abd-Elsalam MM, Alkashif K, Ahmad S, El-Sebaey AM, Hamama MG, Moustafa Ahmed DA. Magnesium Supplementation Alleviates the Toxic Effects of Silica Nanoparticles on the Kidneys, Liver, and Adrenal Glands in Rats. *Toxics.* 2023;11(4):381.
4. Vask A, Titma T, Visnapuu M, Vija H, Kakinen A, Sihtmae M, Pokhrel S, Madler L, Heinlaan M, Kisand V, Shimmo R, Kahru A. Toxicity of 11 Metal Oxide Nanoparticles to Three Mammalian Cell Types In Vitro. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015;15(18):1914-1929.
5. Kim BS, Goligorsky MS. Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease. *Korean J Intern Med.* 2003;18(2): 65-75.
6. Vidic J, Stankic S, Haque F, Ciric D, Goffic RL, Vidy A, Jupille J, Delmas B. Selective antibacterial effects of mixed ZnMgO nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* 2013;15(5): 1595–1604.
7. Hajimiresmaiel J, Davoodi H, Namazi N, Javedan GH, Pazoki-Toroudi H, Ajami M. Effect of omega 3 fatty acids on oxidative stress in acute renal failure induced by ischemia reperfusion. *Iran J Nutr Sci Food Technol.* 2014;8(4): 155-162. [In Persian]
8. Kumar G, Solanki MH, Xue X, Mintz R, Madankumar S, Chatterjee PK, Metz CN. Magnesium improves cisplatin-mediated tumor killing while protecting against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am. J.*

- clinical studies. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):261-269.
28. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *The oncologist.* 2004;9(1):2-10.
29. Costache MI, Ioana M, Iordache S, Ene D, Costache CA, Săftoiu A. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature. *Rom. J. Intern. Med.* 2015;53(3):199-208.
30. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(10):795-803.
31. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009;6(10):569-579.
32. Liu Y, Guo Y, Wang Z, Nie W. Effects of source and level of magnesium on catalase activity and its gene expression in livers of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 2007;61(4):292-300.
33. Wei CC, Wu K, Gao Y, Zhang LH, Li DD, Luo Z. Magnesium Reduces Hepatic Lipd Accumulation in Yellow Catfish (*Pelteobagrusfulvidraco*) and Modulates Lipogenesis and Lipolysis via PPARA, JAK-STAT, and AMPK Pathways in Hepatocytes. *J. Nutr.* 2017;47(6):1070-1078.
34. Asghari A, Jamshidi N, Neshat M.. Serologic evaluation of the effect of administration of magnesium sulfate on the subsequent renal function Induction of reperfusion ischemia in rats. *Comparative Pathobiology. Sci. Res. J.* 2016;13(1):1805-1812.
35. Chien CH, Lee P, Chen CH, Ma M, Lai M, Hsu S. De Novo Demonstration and Co-localization of Free-Radical Production and Apoptosis Formation in Rat Kidney Subjected to Ischemia/Reperfusion. *ASN and JASN.* 2001;12(5):973-982.
36. Kesmati M, Konani M, Torabi M, Khajepour L. Magnesium oxide nanoparticles reduce anxiety induced by
19. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol. Med.* 2008;14(7-8):502-516.
20. Onorati F, Rubino AS, Nucera S, Foti D, Sica V, Santini F, Gulletta E, Renzulli A. Off-pump coronary artery bypass surgery versus standard linear or pulsatile cardiopulmonary bypass: endothelial activation and inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2010;37(4):897-904.
21. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemiareperfusion injury. *Anesthesiol. J.* 2001;94(6):1133-1138.
22. Tsutsui H, Sugiura T, Hayashi K, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y. Moxonidine prevents ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2009;603(1-3):73-78.
23. Dzietko M, Derugin N, Wendland MF, Vexler ZS, Ferriero D.M. Delayed VEGF treatment enhances angiogenesis and recovery after neonatal focal rodent stroke. *Transl. Stroke Res.* 2013;4(2):189-200.
24. Holzer LA, Cör A, Pfandlsteiner G, Holzer G. Expression of VEGF, its receptors, and HIF-1alpha in Dupuytren's disease. *Acta Orthop.* 2013;84(4):420-425.
25. Ghavamipour F, Shahangian SH, Sajedi R., Arab SH, Mansouri K, Aghamaali MR. Development of a highly-potent anti-angiogenic VEGF8-109 heterodimer by directed blocking of its VEGFR-2 binding site. *FEBS J.* 2014;281(19):4479-4494.
26. Sousa Moreira IP, Alexandrino Fernandes, and M. Joao Ramos, Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2007;7(2):223-245.
27. Crawford Y, Ferrara N. VEGF inhibition: insights from preclinical and

46. Moeini-Nodeh S, Rahimifard M, Baeri M, Abdollahi M. Functional Improvement in Rats' Pancreatic Islets Using Magnesium Oxide Nanoparticles Through Antiapoptotic and Antioxidant Pathways. *Biol Trace Elem Res.* 2017;175(1):146-155.
47. Pundir M, Arora S, Kaur T, Singh Pal R, Singh A. Effect of modulating the allosteric sites of N-methyl-D-aspartate receptors in ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *J Surg Res.* 2013;183(2):668-677.
48. Shi LE, Xing L, Hou B, Ge H, Guo X, Tang ZH. Inorganic nano metal oxides used as antimicroorganism agents for pathogen control, current research. *Technol Edu Topics.* 2010; 2010:361-368.
49. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J. INVEST MED.* 1994;42(4):632-639.
50. Choi EK, Jung H, Kwak KH, Yi SJ, Lim JA, Park SH, Park JM, Kim S, Jee D, Lim DG. Inhibition of Oxidative Stress in Renal Ischemia- Reperfusion Injury. *Anesth Analg.* 2017;124(1):204-213.
51. Horibata K, Tanoue A, Ito M, Takemura Y. Relationship between renal function and serum magnesium concentration in elderly outpatients treated with magnesium oxide. *Geriatr Gerontol Int.* 2016;16(5):600-605
52. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am. J. Med.* 2000;109(8):65-78.
53. Zhao ZH, Tang ZH, Zhang W, Liu J, Li B. Magnesium isoglycyrrhizinate protects against renal-ischemia-reperfusion injury in a rat model via anti-inflammation, anti-oxidation and anti-apoptosis. *Mol. Med. Rep.* 2017;16(3):3627-3633.
54. Sousa Moreira I, Fernandes PA, Ramos MJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition-a critical review. *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2007; 7(2):223-245.
- morphine withdrawal in adult male mice. *Physiol. Pharmacol.* 2016;20(3):197-205.
37. Mangalampalli B, Dumala N, Perumalla Venkata R, Grove P. Genotoxicity, biochemical, and biodistribution studies of magnesium oxide nano and microparticles in albino wistar rats after 28-day repeated oral exposure. *Environ. Toxicol.* 2018;33(4):396-410.
38. Taheri YA, Neshat M, Garjani A, Doustar NY. Study the effects of metformin on renal function and structure after unilateral ischemia-reperfusion in rat. *Res Pharm Sci.* 2012;7(5):77.
39. Asgari M, Hafezi Ahmadi MR. Value of Immunohistochemistry in Comparison to Immunofluorescence for Detecting Immune Deposits in renal Biopsy. *Iran. J. Med. Sci.* 2007;14(55):141-148. [In Persian]
40. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry, 5th Edition, Elsevier. 2019.
41. Almond PS, Matas AJ, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS. Predictors of chronic rejection in renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 1993;25(1-2):936.
42. Baker GL, Corry RJ, Autor AP. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase. *Ann. Surg.* 1985;202(5):628-641.
43. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. 3 th ed. Philadelphia: WB Saunders Co. 1995; pp:22-23.
44. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat. Rev.* 1999;25(1):47-58.
45. Lippi G, Montagnana M, Guidi GC. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia?. *Int. J. Cardiol.* 2006;108(3):410- 411.

- KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circ.* 2003; 107(8):1164-1169.
61. Yu Y, Gao Y, Qin J, Kuang CY, Song MB, Yu SY, Cui B, Chen JF, Huang L. Promotes the differentiation of endothelial progenitor cells and reendothelialization in the early phase after vascular injury. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(6):713-724.
62. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989; 246(4935):1306-1309.
63. Rajnoch A, Lodererova A, Szabo, E, Honsova A, Vannay S, Bloudickova I, Viklicky OM. Regulators of angiogenesis in renal Ischemia/Reperfusion Injury in Normotensive and Hypertensive Rats: Effect of Tacrolimus. *Transplant Proc.* 2005;37(1):352-354.
64. Zhou R, Liu H, Hou X, Liu Q, Sun SH, Li W, Cao W, Nie W, Shi CH, Chen W. Bi-functional KIT-PR1P peptides combine with VEGF to protect ischemic kidney in rats by targeting to Kim-1. *Regen. Ther.* 2024;25(1):162-173.
55. Gozal D, Lipton AJ, Jones KL. Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep.* 2002; 25(1):59-65.
56. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W, Grimminger F. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(1):67-70.
57. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-845.
58. Chen L, Wu F, Xia WH, Zhang YY, Xu SY, Cheng F, Liu X, Zhang XY, Wang SM, Tao J. Gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.* 2010; 88(3):462-470.
59. Kwon O, Miller S, Li N, Khan A, Kadry Z, Uemura T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells and endothelial cells may contribute to endothelial repair in the kidney immediately after ischemia-reperfusion. *J Histochem Cytochem.* 2010; 58(8):687-694.
60. Rehman J, Li J, Orschell CM, March