● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست‌ویکم، شمارهٔ ۶، ص ۴۶۸-۴۵۴، ۱۳۹۳

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثر گلایسین و لیزین خوراکی بر بیان ژن RAGE و TGFβ در بافت کلیه رت‌های مبتلا شده به دیابت توسط استرپتوزوتوسین در مقایسه با رت‌های طبیعی

سمیه سادات حیدری[۱]، سیده زهرا بطحائی[۲]، فرشته بهمنی[۳]، غلامرضا مشتاقی کاشانیان*[۴]

خلاصه

مقدمه: نفروپاتی دیابتی یکی از شایع‌ترین دلایل ایجاد مرحله نهایی بیماری کلیوی در جامعه امروزی به شمار می‌رود. قند خون بالا و کنترل نشده و به دنبال آن تولید محصولات نهایی گلیکه سبب فعال شدن مسیرهایی می‌شود که در بروز نفروپاتی دیابتی نقش کلیدی دارد. از میان مسیرهای منتهی شونده به این عارضه می‌توان به افزایش بیان ژن‌های RAGE (Receptor of advanced glycation end products) و TGFβ (Transforming growth factor beta) اشاره کرد. در مطالعه حاضر به منظور یافتن ترکیباتی که ممکن است سبب تأخیر در نفروپاتی دیابتی شود و یا از آن جلوگیری کند، اثر اسیدآمینه‌های گلایسین و لیزین بر میزان بیان ژن RAGE و TGFβ در بافت کلیه رت‌های مبتلا به دیابت بررسی گردید.

روش: موش‌های صحرایی پس از ابتلا به دیابت توسط استرپتوزوتوسین، در گروه‌های مجزا طی ۱۲ هفته با گلایسین ۱ درصد و لیزین ۰/۱ درصد در آب خوراکی تیمار شدند و میزان قند خون و محصولات نهایی گلیکه آن‌ها در این مدت ارزیابی گردید. میزان تغییرات بیان RAGE و TGFβ در بافت کلیه نیز با روش نیمه کمی RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان قند خون، محصولات نهایی گلیکه سرم، میزان بیان ژن‌های RAGE و TGFβ در بافت کلیه رت‌های مبتلا به دیابت تیمار شده با گلایسین و لیزین در مقایسه با رت‌های مبتلا به دیابت بدون تیمار کاهش معنی‌داری پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج مطالعه حاضر، ملازم‌های گلایسین و لیزین خوراکی بدون ایجاد مسمومیت توانایی کاهش عوارض ابتلا به دیابت و مسدود کردن مسیرهای ابتلا به نفروپاتی در رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ را دارد. این خصوصیت آن‌ها را می‌توان با اثر این ملازم‌ها در کاهش قند خون و محصولات نهایی گلیکه سرم مرتبط دانست. از آن‌جایی که در مطالعات دیگر نیز اثرات مثبت هر دو اسیدآمینه در نفروپاتی دیابتی مشاهده شده است، تعیین دوز مؤثر آن‌ها در مطالعات دیگر ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، RAGE، AGE، گلایسین، لیزین، ملازم‌های شیمیایی

۱- کارشناس ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران ۲- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۳- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران ۴- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** moshtaghik@kmu.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۹ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۳/۳/۱۴ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۳/۲۸

مقدمه

دیابت شیرین یا قندی که به طور عمده با افزایش قند خون شناخته می‌شود، نوعی اختلال مزمن است که در اثر کمبود انسولین و یا مقاومت به آن به وجود می‌آید (۱). نفروپاتی دیابتی از شایع ترین دلایل ایجاد مرحله نهایی بیماری کلیوی است. این عارضه جانبی و بلند مدت یکی از دلایل ناتوانی و مرگ و میر بیماران مبتلا به دیابت در جهان محسوب می‌شود (۲). با پیشرفت دیابت و افزایش قند خون، عمل گلیکه شدن پروتئین‌های بدن افزایش می‌یابد. گلوکز به صورت غیر آنزیمی با گروه آمین در پروتئین‌ها واکنش نشان می‌دهد و در نهایت ساختارهای پیچیده‌ای به نام محصولات نهایی گلیکه شده پیشرفته (Adavanced glycation end products یا AGEs) به وجود می‌آورد (۳). AGEs خارج سلولی با گیرنده خود RAGE (Receptor of advanced glycation end products) واکنش داده، موجب وقایع متعدد درون سلولی می‌شود (۴).

AGEهایی که با واسطه گیرنده پیام خود را به سلول داده‌اند به همراه AGEهایی که در سلول به وجود آمده‌اند از طریق فعال کردن پروتئین کیناز C، MAP کیناز (Mitogen-activated protein kinase) و NF-κB (Nuclear factor-κB) باعث فعال‌سازی شاخص‌های مختلف رشد و از جمله TGFβ (Transforming growth factor beta) می‌گردند. فعال‌سازی این شاخص رشدی سبب القای ساخت بیشتر کلاژن نوع ۱ و ۴ می‌شود و از بیان پروتئوگلیکان‌ها ممانعت می‌کند و در نتیجه پلیمریزاسیون و افزایش غیر معمول ماتریکس خارج سلولی رخ می‌دهد (۵). افزایش تعداد و حجم انواع سلول‌های گلومرولی و توبولی و همچنین ایجاد بافت مزانژیالی به همراه ضخیم شدن غشای پایه توبولی و گلومرولی سبب تظاهرات بالینی نفروپاتی دیابتی مانند کاهش پاک‌سازی و افزایش آلبومین ادراری می‌شود (۶). مطالعات انجام گرفته بر روی موش‌های مبتلا شده به دیابت توسط استرپتوزوتوسین نشان داده است که تجویز آنتی‌بادی ضد TGFβ از افزایش حجم بافت کلیه، ایجاد ماتریکس مزانژیالی، افزایش بیان فیبرونکتین و کلاژن و همچنین اختلال در عملکرد کلیوی جلوگیری می‌کند (۷). اختلالات حاصل از قند خون بالا تا حدودی با از بین بردن واکنش بین AGE:RAGE روند معکوس دارد (۸).

سرم گلیکه شده، میزان تولید RAGE را به صورت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های بتای پانکراس افزایش می‌دهد و سبب استفاده از آنتی‌بادی علیه RAGE و سرکوب تولید آن و کاهش آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (۹). همچنین استفاده از آنتی‌بادی علیه RAGE و یا حذف این ژن در مدل‌های موشی نفروپاتی دیابتی روند افزایش وزن کلیه، حجم گلومرولی، مزانژیوم و ترشح آلبومین ادراری را کند کرده، در عین حال پاک‌سازی کراتینین و ضخامت غشای پایه را به حالت طبیعی بازمی‌گرداند (۱۱، ۱۰). RAGE به طور معمول به میزان کمی در اندوتلیوم، عضلات صاف، مزانژیوم و مونوسیت‌ها بیان می‌شود (۵)، اما میزان بالای بیان آن در شبکیه، مزانژیوم و آئورت همزمان با افزایش میزان AGEs در پستانداران صورت می‌گیرد (۱۴-۱۲). بنابراین ترکیباتی که بتوانند میزان قند خون و محصولات گلیکه را کاهش دهند، از بیان ژن‌های دخیل در بروز نفروپاتی جلوگیری به عمل می‌آورند.

اثرات سودمند برخی از اسیدهای آمینه در بهبود شرایط دیابت مشاهده شده است (۱۵). گزارش‌ها نشان داده‌اند که در نتیجه تجویز آرژنین میزان محصولات گلیکه (از جمله فروکتوزآمین) و بیان ژن RAGE در بافت کلیه کاهش یافته و در مجموع کاهش آسیب استرس اکسیداتیو در رت‌های مبتلا شده به دیابت توسط استرپتوزوتوسین مشاهده می‌شود (۱۶). سیستئین خوراکی نیز با جلوگیری از تشکیل محصولات گلیکه و بهبود پروفایل لیپیدی می‌تواند تمام عوامل خطر مرتبط با بروز عوارض دیابت را کاهش دهد

(۱۷). در همین راستا مطالعات مرتبط با اسیدآمینه گلایسین نشان داد که این اسیدآمینه موجب کاهش میزان کلسترول، قند خون و هموگلوبین گلیکه شده در موش‌های مبتلا به دیابت می‌شود (۱۸). در مطالعه‌ای بیان شد که گلایسین خوراکی می‌تواند موجب کاهش محصولات نهایی گلیکه، کنترل قند خون و به تأخیر افتادن شروع آب مروارید وابسته به دیابت و کاهش میزان پیشرفت آن در رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ از طریق مهار استرس اکسیداتیو و مسیر پلی‌اول شود (۱۹).

نقش اسیدآمینه لیزین نیز به عنوان مهار کننده گلیکه شدن پروتئین‌ها و ملازم شیمیایی در بهبود فعالیت و تاخوردگی پروتئین‌ها در مدل رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ القا شده با استرپتوزوتوسین مؤثر بود. لیزین اثری روی سطح سرمی انسولین ندارد، اما قادر است برخی از شاخص‌های مرتبط با دیابت را بهبود بخشد (۲۰). در مطالعه دیگری گزارش شد که تجویز لیزین می‌تواند میزان گلیکه شدن کلاژن غشای پایه گلومرولی و آلبومین ادراری را در رت‌های مبتلا به دیابت کاهش دهد (۲۱). با در نظر گرفتن عملکرد مطلوب هر دو اسیدآمینه در کاهش عوارض دیابت و کند کردن روند پیشرفت برخی از عوارض، در این مطالعه به بررسی تأثیر این دو ترکیب بر میزان بیان دو ژن RAGE و TGFβ به عنوان شاخص‌های اصلی در بروز عارضه برگشت‌ناپذیر نفروپاتی دیابتی (در دیابت نوع ۱) پرداخته شد.

روش بررسی

در مطالعه حاضر موش‌های صحرایی ویستار جنس نر به مدت ۴ هفته جهت سازگار شدن با محیط آزمایشگاه و رسیدن به میانگین وزنی موردنظر (۱۴/۲ ± ۲۲۷/۹ گرم) نگهداری و سپس به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول با تزریق ترکیب استرپتوزوتوسین به دیابت مبتلا شدند. به این منظور از استرپتوزوتوسین با دوز ۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در بافر سدیم سیترات ۰/۱ مولار و pH برابر با ۴/۵ به صورت درون صفاقی (Intraprotaneal یا IP) استفاده گردید و ۷۲ ساعت پس از تزریق استرپتوزوتوسین و اندازه‌گیری گلوکز خون حیوانات، تنها موش‌های صحرایی که گلوکز خون آن‌ها ۱۵ ≤ میلی‌مول بر لیتر بود (۲۲)، استفاده شدند. موش‌های مبتلا به دیابت به طور تصادفی به دو گروه بدون درمان و تحت درمان و در هر گروه ۱۵ سر تقسیم گردیدند. موش‌های سالم پس از تزریق بافر سیترات بدون استرپتوزوتوسین مانند موش‌های مبتلا به دیابت به دو گروه بدون درمان و تحت درمان و در هر گروه ۱۰ سر تقسیم شدند. موش‌های سالم و مبتلا به دیابت یک هفته پس از تزریق و اثبات دیابت تحت تیمار با گلایسین (سیگما- آلمان) ۱ درصد در آب‌خوراکی (۱۹) و لیزین (سیگما- آلمان) ۰/۱ درصد در آب خوراکی (۲۰) قرار گرفتند.

اندازه‌گیری گلوکز سرم و محصولات نهایی گلیکه

میزان گلوکز سرم بر اساس روش رنگ‌سنجی آنزیمی (ELITech, SEES, France) و با استفاده از اتوآنالایزر مدل بیوتکنیکا (Biotechnica, Rome, Italy) BT ۳۵۰۰ تعیین شد. برای اندازه‌گیری مقدار محصولات نهایی گلیکه شده (AGEs) سرم، بر اساس روش Kalousova و همکاران (۲۳)، نمونه سرم به نسبت ۱ به ۵۰ توسط بافر فسفات با pH = ۷/۴ رقیق شد. سپس شدت فلورسانس در طول موج نشری ۴۴۰ نانومتر با طول موج تحریکی ۳۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفلوریمتر شیماتزو مدل ۵۰۰۰ (Shimadzu, Kyoto, Japan) RF ثبت و به صورت درصد نشر فلورسانس (Fluorescence intensity یا FI) بیان گردید.

اندازه‌گیری تغییرات میزان بیان ژن RAGE و TGFβ

پس از ۱۲ هفته تیمار با گلایسین و لیزین، رت‌ها توسط کتامین بیهوش و سپس کشته شدند. به منظور استخراج RNA (Ribonucleic acid) کل بافت با استفاده از ترایزول، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه کلیه در ۱ میلی‌لیتر ترایزول روی یخ هموژن گردید. سپس در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ازای هر ۱ میلی‌لیتر ترایزول اولیه، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول رویی افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به فاز آبی حاوی RNA، ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل الکل اضافه و پس از انکوبه شدن در دمای اتاق در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب RNA حاصل با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد شستشو داده شد و پس از سانتریفیوژ در ۷۵۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در ۵۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز حل شد. بررسی کمی RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ (Thermo scientific Nano drop 2000c Spectrophotometer, USA) و بررسی کیفی آن توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲ درصد انجام گرفت.

بلافاصله پس از استخراج RNA، ساخت DNA مکمل (Complementary DNA) توسط پرایمر ۱۵ (dt) oligo-p و AMV reverse transcriptase و سپس تکثیر قطعه موردنظر [واکنش PCR (Polymerase chain reaction)] با استفاده از پروتکل پیشنهادی شرکت فرمنتاز به ترتیب توسط RevertAid H Minus First St cDNA Syn Kit, Fermentase, Germany و PCR Master Mix(2x)-2, Fermentase, Germany. توسط دستگاه Thermal cycler (Bio Rad-USA) انجام شد. برای اندازه گیری نسبت میزان بیان ژن ها از کنترل داخلی GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) استفاده گردید. پرایمرهای مناسب برای ژن RAGE و TGFβ کنترل داخلی توسط نرم‌افزارهای Oligo نسخه ۶ و Gene Runner طراحی شدند.

توالی پرایمرها برای ژن RAGE شامل ۵′-CACTGGATAAAAGATGGCAC پرایمر رهبر و ۵′-GAGTCTGGGTTGTCGTTTTC پرایمر پیرو (اندازه محصول ۳۰۳ جفت باز- Gene Bank: NC_005119)، ۵′-TCAGCTCCACAGAGAAGAACTG پرایمر رهبر و ۵′-CGATCATGTTGGACAACTGCTC پرایمر پیرو برای ژن TGFβ (اندازه محصول ۲۹۴ جفت باز- Gene Bank :NC_005100) و ۵′-AACGACCCCTTCATTGAC پرایمر رهبر و ۵′-TCCACGACATACTCAGCAC پرایمر پیرو برای ژن GAPDH (اندازه محصول ۱۹۱ جفت باز- Gene Bank:NC_005103) بود.

مراحل چرخه دمایی به این صورت انجام شد: دمای ابتدایی جدا شدن دو رشته ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، جدا شدن دو رشته در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، هیبرید شدن پرایمرها به ژن‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن TGFβ، دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد برای ژن RAGE و در هر دو دمای ۵۳ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن GAPDH به مدت ۴۵ ثانیه به تعداد ۳۴ چرخه، دمای پیشروی آنزیم پلی‌مراز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای پیشروی نهایی آنزیم ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه. پس از انجام واکنش PCR، محصولات برای اطمینان از تکثیر قطعه موردنظر و تعیین کمیت آن بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد و به وسیله دستگاه ژل داک بررسی گردید. در نهایت دانسیته باندهای ظاهر شده به وسیله یک نرم‌افزار آنالیز ژن (Fire reader) بررسی و اندازه‌گیری شد. میزان دانسیته ژن مورد مطالعه نسبت به کنترل داخلی به صورت درصد مبنای تغییرات میزان بیان ژن‌ها در مقایسه با گروه شاهد طبیعی قرار داده شد (۲۵، ۲۴).

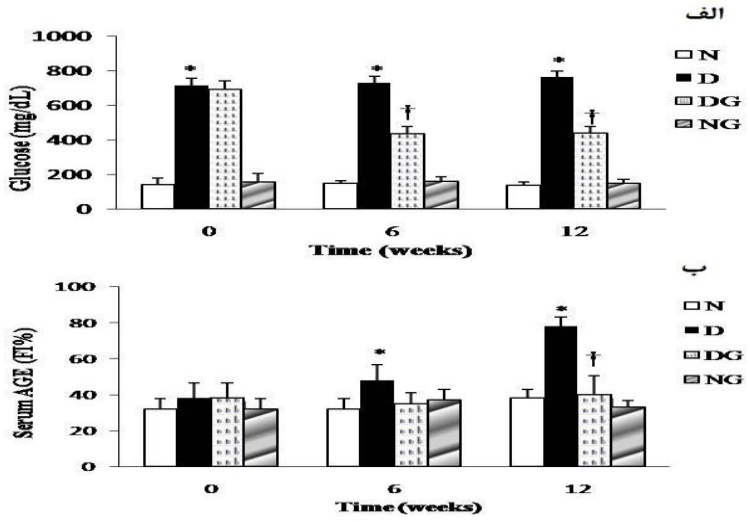
تمام داده‌ها و نمودارها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه شد. داده‌های حاصل در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون‌های ANOVA یک طرفه و Tukey در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل گردید. $P < ۰/۰۵$ مبنای معنی‌داری اختلاف بین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی میزان گلوکز خون و AGEs سرم

شکل ۱، قسمت الف تغییرات میزان گلوکز خون سرم در گروه رت‌های مبتلا به دیابت تحت تیمار با گلایسین و رت‌های بدون تیمار را در مدت انجام مطالعه نشان می‌دهد.

میزان گلوکز خون سرم در گروه‌های مبتلا به دیابت در ابتدای مطالعه بالاتر از میزان آن در گروه‌های سالم بود. پس از تجویز گلایسین به یک گروه از افراد مبتلا به دیابت، میزان غلظت گلوکز به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت بدون تیمار کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). در شکل ۱، قسمت ب میزان تشکیل محصولات نهایی گلیکه در رت‌های مبتلا به دیابت تا انتهای مطالعه در مقایسه با سه گروه دیگر به تدریج افزایش یافت؛ اما میزان AGEs در سرم رت‌هایی که گلایسین دریافت کرده بودند، کاهش معنی‌داری پیدا کرد و مقدار آن به گروه‌های سالم نزدیک شد ($P < ۰/۰۵$).



شکل ۱. *قسمت الف: تغییرات میزان گلوکز خون در اثر تیمار با گلاسین و قسمت ب: تغییرات میزان محصولات نهایی گلیکه شده پیشرفته سرم در اثر تیمار با گلاسین*

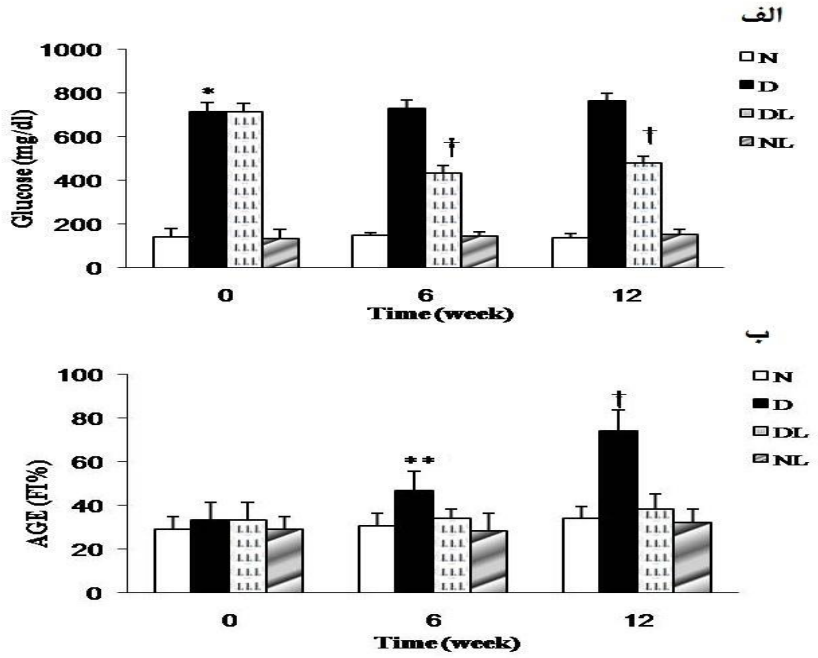
N: رت‌های سالم، D: رت‌های مبتلا به دیابت، DG: رت‌های مبتلا به دیابت تیمار شده با گلایسین، NG: رت‌های سالم تیمار شده با گلایسین

*وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مبتلا به دیابت و گروه‌های سالم ($P < ۰/۰۵$)

† وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه مبتلا به دیابت و گروه مبتلا به دیابت تحت تیمار با گلایسین ($P < ۰/۰۰۱$)

نمودار تغییرات میزان گلوکز خون سرم در گروه رت‌های مبتلا به دیابت و سالم تحت تیمار با لیزین نشان داد که میزان گلوکز خون در رت‌های مبتلا به دیابت طی مدت ۱۲ هفته بالاتر از گروه سالم بود و با تجویز لیزین به گروه رت‌های مبتلا به دیابت میزان آن به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت بدون تیمار

کاهش یافت (P < ۰/۰۵) (شکل ۲، قسمت الف). میـزان AGEs سرمی نیز از زمان شروع مطالعه تـا انتهـای آن بـه تدریج در گروه مبتلا به دیابت افزایش یافت؛ به گونـه‌ای که در پایان ۱۲ هفته مطالعه، میزان AGEs گروه مبـتلا بـه دیابت به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود (P < ۰/۰۰۱) و تجویز لیزین سبب کاهش معنی‌دار این شاخص در رت‌های مبتلا به دیابت تحـت تیمـار شـد (P < ۰/۰۰۱) (شکل ۲، قسمت ب).



شکل ۲. *قسمت الف: تغییرات میزان گلوکز خون در اثر تیمار با لیزین و قسمت ب: تغییرات میزان محصولات نهایی گلیکه شده پیشرفته سرم در اثر تیمار با لیزین*

N: رت‌های سالم، D: رت‌های مبتلا به دیابت، DL: رت‌های مبتلا به دیابت تیمار شده با لیزین، NL: رت‌های سالم تیمار شده با لیزین

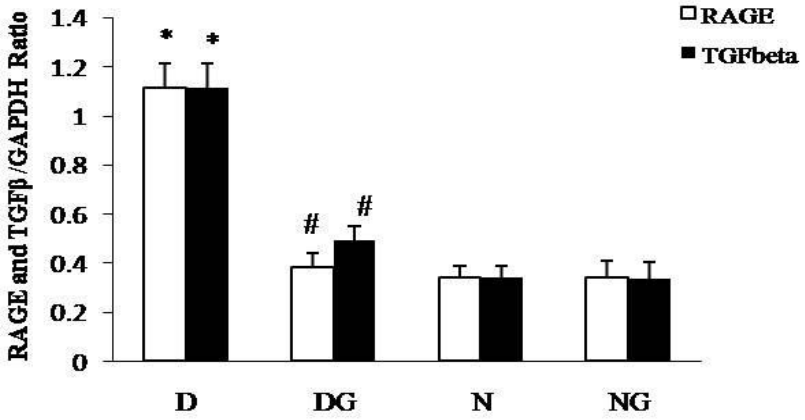
*وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مبتلا به دیابت و گروه‌های سالم (P < ۰/۰۵)

**وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مبتلا به دیابت و گروه‌های سالم (P < ۰/۰۰۱)

†معنی‌داری تفاوت بین گروه مبتلا به دیابت با گروه مبتلا به دیابت تحت تیمار با لیزین (P < ۰/۰۰۱)

بررسی تغییرات بیان ژن RAGE و TGFβ

در انتهـای مطالعـه میـزان بیـان ژن RAGE در گـروه رت‌هایی که مبتلا به دیابت بودند، نسبت به سایر گروه‌هـا افزایش یافت (P < ۰/۰۰۱) و کاهش معنی داری در میزان بیان آن در رت‌های مبتلا به دیابت دریافت کننده گلایسین در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت مشاهده گردید و میـزان آن به گروه های سالم نزدیک شـد (P < ۰/۰۰۱). همـین نتایج در رابطه با تغییرات بیان ژن TGFβ در گروه مبتلا بـه دیابت و گروه تحت تیمار با گلایسین به دسـت آمـد؛ در حالی که میزان بیان ژن TGFβ در گروه مبتلا بـه دیابـت بدون تیمار افزایش معنی داری داشت (P < ۰/۰۰۱). میزان بیان این ژن در گروه‌های مبتلا به دیابت تحـت تیمـار بـا گلایسین نسبت به گروه مبتلا به دیابت بدون تیمار کاهش معنی‌داری را نشان داد (P < ۰/۰۰۱) (شکل‌های ۳ و ۴).

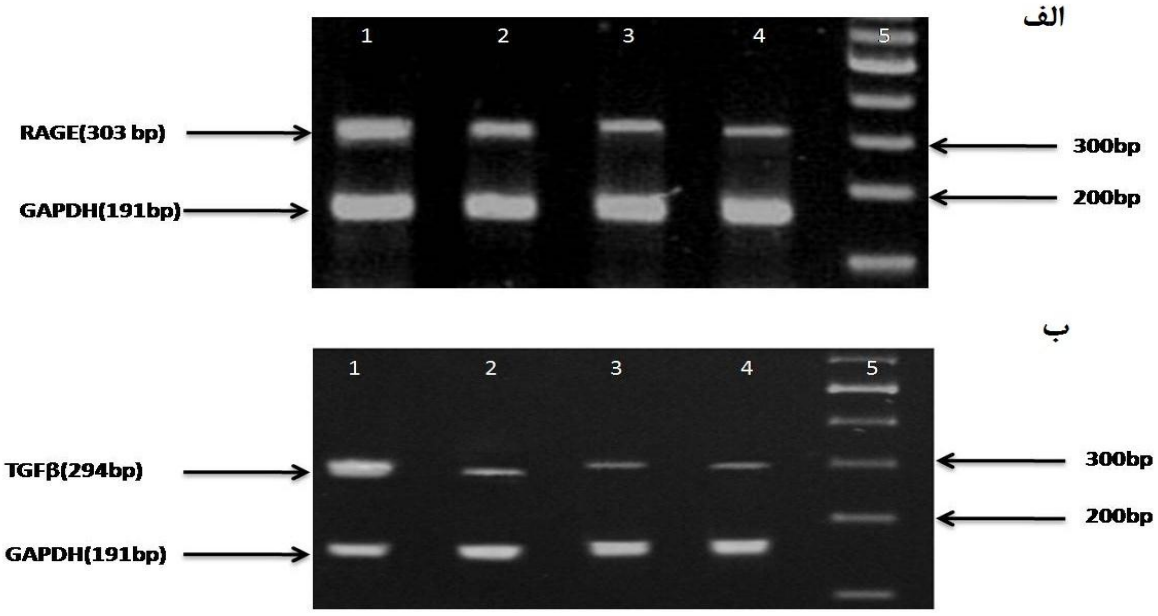


شکل ۳. مقایسه تغییرات بیان ژن *RAGE* (*Receptor of advanced glycation end products*) و *TGFβ* (*Transforming growth factor beta*) نسبت به کنترل داخلی *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) در بافت کلیه رت‌های سالم، مبتلا به دیابت و رت‌های سالم و مبتلا به دیابت تیمار شده با گلایسین

D: رت‌های مبتلا به دیابت، DG: رت‌های مبتلا به دیابت تحت تیمار با گلایسین، N: رت‌های سالم، NG: رت‌های سالم تحت تیمار با گلایسین

*وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با سایر گروه‌ها ($P < ۰/۰۰۱$)

#وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه مبتلا به دیابت تیمار شده با گلایسین در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت بدون تیمار ($P < ۰/۰۰۱$)

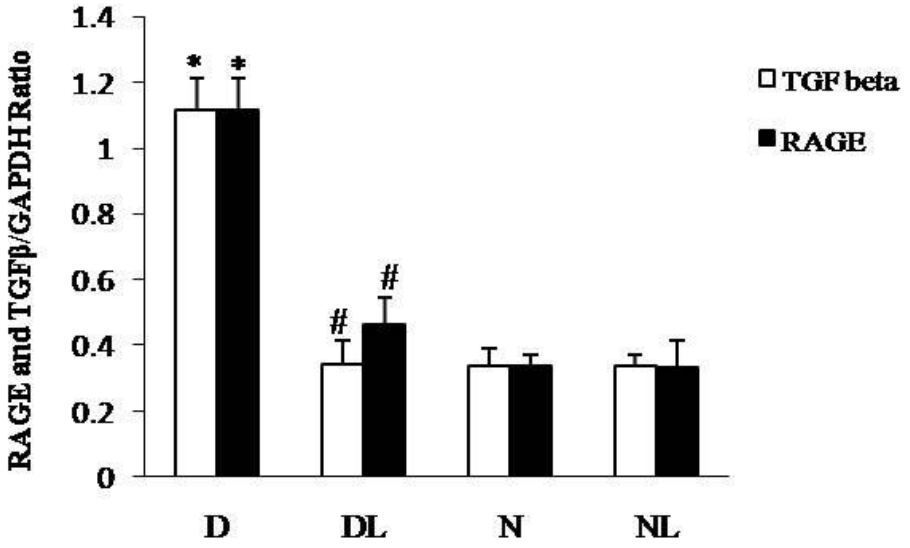


شکل ٤. الکتروفورز روی ژل آگارز مربوط به محصول *PCR* (*Polymerase chain reaction*)؛ قسمت الف: تکثیر قطعه ژنی *RAGE* (*Receptor of advanced glycation end products*) و کنترل داخلی *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)

و قسمت ب: تکثیر قطعه ژنی *TGFβ* (*Transforming growth factor beta*) و کنترل داخلی *GAPDH*

ستون ۱: گروه مبتلا به دیابت، ستون ۲: گروه مبتلا به دیابت تحت تیمار با گلایسین، ستون ۳: گروه سالم، ستون ۴: گروه سالم تیمار شده با گلایسین، ستون ۵: نشانگر جایگاه وزنی باندها

ادامه روند دیابت تا ۱۲ هفته در رت‌های مبتلا به دیابت بدون تیمار که سبب شده بود میزان بیان ژن RAGE در این گروه نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری پیدا کند ($P < ۰/۰۰۱$)، در گروه شاهد تحت درمان با لیزین نتایج دیگری را نشان داد و تیمار رت‌های مبتلا به دیابت با لیزین منجر به کاهش معنی‌دار این ژن در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت بدون تیمار شد. میزان بیان ژن TGFβ در گروه رت‌های مبتلا به دیابت که لیزین دریافت کردند با کاهش معنی‌دار نسبت به گروه مبتلا به دیابت همراه بود و میزان بیان ژن TGFβ در اثر دیابت افزایش معنی‌داری را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد. تیمار گروه‌های سالم با گلایسین و لیزین هیچ گونه تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های RAGE و TGFβ در مقایسه با گروه سالم بدون تیمار نداشت ($P > ۰/۰۵$) (شکل‌های ۵ و ۶).

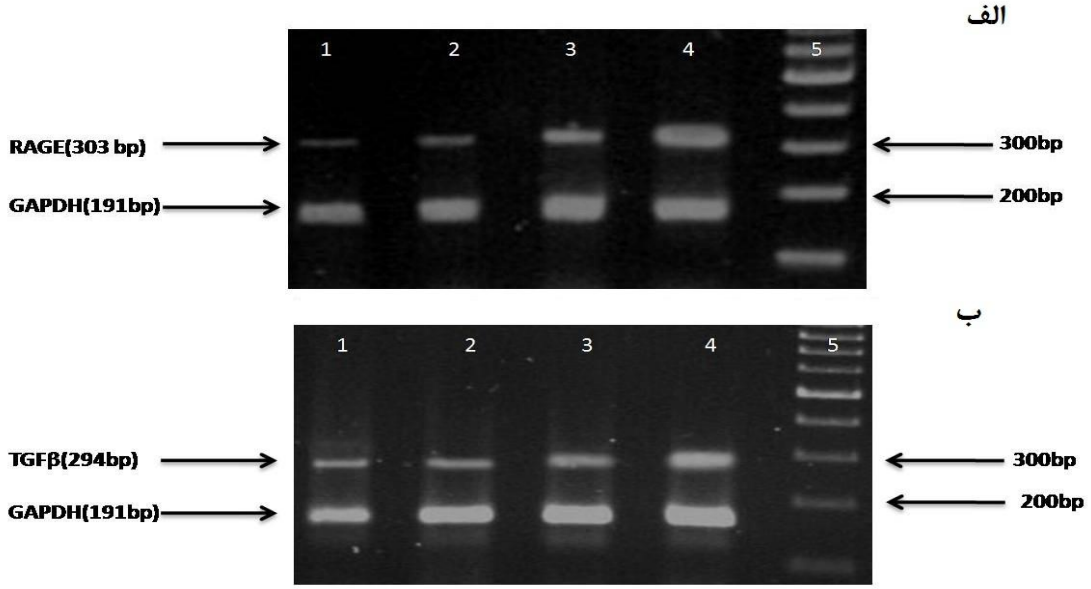


شکل ۵. مقایسه تغییرات بیان ژن *RAGE* (*Receptor of advanced glycation end products*) و *TGFβ* (*Transforming growth factor beta*) نسبت به کنترل داخلی *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) در بافت کلیه رت‌های سالم، مبتلا به دیابت و رت‌های سالم و مبتلا به دیابت تیمار شده با لیزین

D: رت‌های مبتلا به دیابت، DL: رت‌های مبتلا به دیابت تحت تیمار با لیزین، N: رت‌های سالم، NL: رت‌های سالم تحت تیمار با لیزین

*وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با سایر گروه‌ها ($P < ۰/۰۰۱$)

#وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مبتلا به دیابت تیمار شده با لیزین در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت بدون تیمار ($P < ۰/۰۰۱$)



شکل ٦. الکتروفورز روی ژل آگارز مربوط به محصول *PCR* (*Polymerase chain reaction*)؛ قسمت الف: تکثیر قطعه ژنی *RAGE* (*Receptor of advanced glycation end products*) و کنترل داخلی *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) و قسمت ب: تکثیر قطعه ژنی *TGFβ* (*Transforming growth factor beta*) و کنترل داخلی *GAPDH*

ستون ۱: گروه سالم تیمار شده با لیزین، ستون ۲: گروه سالم، ستون ۳: گروه مبتلا به دیابت تحت تیمار با لیزین، ستون ۴: گروه مبتلا به دیابت، ستون ۵: نشانگر جایگاه وزنی باندها

بحث

در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار گلوکز خون، محصولات نهایی گلیکه سرم، گیرنده محصولات نهایی گلیکه و فاکتور رشد تبدیلی بتا در بافت کلیه رت‌های مبتلا به دیابت شده با استرپتوزوتوسین در اثر سه ماه تیمار با اسیدهای آمینه گلایسین و لیزین خوراکی در مقایسه با سایر گروه‌ها مشاهده شد. با تجویز ملازم‌های شیمیایی گلایسین و لیزین (به علت داشتن گروهای آمین موجود در ساختار خود) بین گروه سالم و گروه سالمی که گلایسین و لیزین دریافت کردند، در هیچ کدام از شاخص‌ها تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین دوز انتخابی برای گلایسین و لیزین فارغ از اثرات سمی بود.

۲۵-۱۵ درصد افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۴۰-۳۰ درصد افراد مبتلا به دیابت نوع دو دچار نفروپاتی دیابتی می‌شوند که دلیل اصلی آن کنترل نامناسب قند خون است. افزایش قند خون به طرق مختلفی موجب ایجاد نفروپاتی دیابتی می‌شود که از میان آن‌ها می‌توان به تولید محصولات نهایی گلیکه و واکنش با گیرنده آن اشاره کرد (۲). ملازم‌های شیمیایی نیز از جمله ترکیباتی هستند که با تغییر در وضعیت یونی، حرارت، pH و همچنین استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش قند خون می‌توانند مانع از تجمع محصولات گلیکه و شکل‌گیری ناصحیح پروتئین‌ها شوند (۲۶). اثر کاهندگی میزان گلوکز و محصولات نهایی گلیکه سرم توسط گلایسین ۱ درصد و لیزین ۰/۱ درصد پس از تنها ۶ هفته تیمار در رت‌های مبتلا به دیابت در مطالعه حاضر مشاهده شد و تا انتهای ۱۲ هفته ادامه یافت. این یافته همسو با نتایجی است که در مطالعات پیشین در این خصوص صورت گرفته است (۲۰، ۱۹).

پیش از این در مطالعه دیگری، تجویز گلایسین با دوز ۱ درصد به مدت ۶ ماه در رت‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ موجب کاهش میزان هموگلوبین گلیکه و بهبود پروفایل لیپیدی و همچنین کاهش میزان افزایش حجم غشای پایه گلومرولی در بافت کلیه شد و بر همین اساس گزارش شد که گلایسین به دلیل خاصیت ضد گلیکه کنندگی خود می‌تواند از عوارض دیابت جلوگیری کند (۱۸). کاهش میزان AGEهای سرمی، HbA1c (Hemoglobin A1c) و فروکتوزآمین حتی پس از ۲۵ روز تیمار با گلایسین خوراکی در موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ نیز مشاهده شده است (۲۷).

لیزین نیز علاوه بر کاهش گلوکز سرم، AGEهای سرمی و HbA1c، با افزایش سطح پروتئین شوک حرارتی در شرایط استرس‌زای دیابت می‌تواند به عنوان ملازم شیمیایی در شرایط دیابت عمل کند (۲۰). مکانیسم عمل گلایسین و لیزین در کاهش قند خون به خوبی مشخص نیست، اما ممکن است این اثر به دلیل واکنش بین گلوکز و این دو اسیدآمینه باشد (۲۸). اثر افزایش پاسخ به انسولین در پاسخ به تجویز گلایسین مشاهده شده است (۲۹). گلایسین خوراکی به طور مستقیم و یا غیر مستقیم با تحریک ترشح هورمون روده‌ای، برداشت گلوکز از گردش خون توسط انسولین را تقویت و اثر گلوکاگون در تولید گلوکز اندوژن را مهار می‌کند (۳۰). علاوه بر این، گلایسین به صورت رقابتی به گلوکز متصل می‌شود و با تولید گلوکوزیل- گلایسین روند ایجاد محصولات گلیکه را مهار می‌کند (۲۷). متابولیسم لیزین نیز می‌تواند مسوول کاهش میزان گلوکز و محصولات نهایی گلیکه در مطالعه حاضر باشد. در مسیر کاتابولیسم لیزین در کبد، آلفاکتوگلوتارات به عنوان کوسوبسترا مصرف می‌شود. لیزین اضافه‌ای که به کبد وارد شده است با مقدار بیشتری از آلفاکتوگلوتارات حاصل از متابولیسم گلوکز کاتابولیزه می‌گردد و بنابراین می‌توان انتظار داشت که میزان گلوکز خون و محصولات گلیکه کاهش یابد (۲۰).

بررسی اثر گلایسین و لیزین خوراکی در مطالعه حاضر کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن‌های RAGE و TGFβ را در بافت کلیه رت‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. نمونه موفقیت‌آمیز اثر تجویز گلایسین و لیزین در کاهش گلوکز سرم، مهار گلیکه شدن پروتئین‌ها و تشکیل اتصالات عرضی در آلفا کریستالین لنز چشمی و جلوگیری از آب مروارید دیابتی در رت‌ها می‌باشد و نشان می‌دهد که گلایسین و لیزین به دلیل کاهشی که در میزان گلوکز خون و محصولات نهایی گلیکه ایجاد کرده‌اند، می‌توانند در جلوگیری از فعال شدن مسیرهای نفروپاتی دیابتی مؤثر باشند (۲۲، ۱۹).

در جستجوهای صورت گرفته مطالعه‌ای مبنی بر اثر این دو اسیدآمینه بر روی بیان ژن‌های مورد مطالعه یافت نشد، اما مطالعات متعددی اثرات محافظتی گلایسین و لیزین را روی بافت کلیه نشان داده‌اند. گلایسین با دوز مناسب موجب کاهش گلیکه شدن غشای پایه گلومرولی و کاهش نفروپاتی دیابتی می‌گردد (۳۱). مطالعه مورفولوژی سلول‌های کلیوی رت‌های تیمار شده با گلایسین حاکی از ضخامت کمتر کلیه و اسکلروزه شدن آن در مقایسه با رت‌های مبتلا به دیابت درمان شده است. همچنین محصولات نهایی گلیکه شده بر روی اسکلروزه شدن نفرون‌ها و افزایش ساخت کلاژن نوع چهار اثر مثبتی دارند و کاهش اسکلروزه شدن بافت کلیه ناشی از اثرات کاهشی بر روی گلیکه شدن پروتئین‌ها می‌باشد (۲۷). اثر مثبت گلایسین در کاهش فیبروزه شدن بافت کبد به دنبال

کاهش میزان TGFβ سرمی و بافتی و همچنین کاهش ساخت کلاژن نوع آلفا یک در نمونه‌های آزمایشگاهی نیز مشاهده شده است (۳۳، ۳۲).

یکی از دلایل روشن شدن مسیر التهابی توسط TGFβ، به وجود آمدن گونه‌های فعال اکسیژن علاوه بر سایر عوامل است (۳۴). از آن‌جایی که مصرف گلایسین از ایجاد هیپوکسی و تشکیل رادیکال‌های آزاد ممانعت به عمل می‌آورد و با اثر بر سلول‌های التهابی مانند ماکروفاژها مانع از فعال شدن سیتوکین‌های التهابی می‌گردد (۳۵)، می‌توان گفت که گلایسین ممکن است اثرات مطلوب خود را از طریق فعال‌سازی کانال‌های کلریدی که در غشای پلاسمایی قرار دارند، اعمال کند و با کاهش میزان کلسیم سیتوزولیک در سلول‌های کوپفر کبد و سلول‌های سفید موجب کاهش فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی شامل ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها شود و به دنبال آن تولید مولکول‌های التهابی مانند سیتوکین‌ها و ایکوزانوئیدها را کاهش دهد (۳۶، ۳۲). در مطالعه حاضر نیز این مکانیسم‌ها با احتمال بالایی منجر به کاهش بیان TGFβ در بافت کلیه رت‌های مبتلا به دیابت تیمار شده با گلایسین گردید.

اثرات درمانی لیزین در دیابت نیز شبیه به گلایسین است. کاهش میزان گلیکه شدن کلاژن غشای پایه گلومرولی و میزان آلبومین ادراری در رت‌های مبتلا به دیابت (۲۱)، کاهش میزان پاک‌سازی گلومرولی، پاک‌سازی اسید هیپوریک و پروتئین ادراری همراه با کاهش معنی‌دار سطح گلوکز پلاسما در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ (۳۷) و همین طور کاهش اتصالات عرضی بین زیرواحدهای فیبرینوژن در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ در شرایط آزمایشگاهی (۳۸) نشان دهنده ارتباط معنی‌دار بین کاهش گلوکز خون و محصولات نهایی گلیکه و کاهش تظاهرات بالینی نفروپاتی دیابتی در اثر تجویز لیزین خوراکی و پتانسیل بالای لیزین در کاهش عوارض دیابت می‌باشد. با توجه به مطالعات مذکور، کاهش بیان ژن‌های RAGE و TGFβ در بافت کلیه رت‌های مبتلا به دیابت نیز می‌تواند به دلیل کاهش محصولات نهایی گلیکه و گلوکز خون در اثر دریافت لیزین در مطالعه حاضر باشد.

مطالعات نشان داده‌اند، ترکیباتی که مانع از گلیکه شدن و ایجاد اتصالات عرضی در پروتئین ها می شوند موجب کاهش بیان گیرنده محصولات نهایی گلیکه و نیز TGFβ در بافت کلیه شده، از پیشرفت نفروپاتی جلوگیری می‌کنند (۴۱-۳۹). به کار گرفتن ملازم‌های شیمیایی گلایسین و لیزین در مطالعه حاضر توانست میزان گلوکز خون و محصولات نهایی گلیکه سرمی را کاهش دهد. به احتمال زیاد کاهش میزان بیان RAGE و TGFβ در مطالعه حاضر را می‌توان به کاهش میزان AGEs سرمی و قند خون رت‌های مبتلا به دیابت نسبت داد. از آن‌جایی که ملازم‌های شیمیایی ترکیبات طبیعی مطابق با شرایط فیزیولوژیکی بدن انسان هستند و واکنش ایمنی ایجاد نمی‌کنند، بنابراین عوارض ایمونولوژیک ناشی از ترکیبات مصنوعی را ندارند (۴۳، ۴۲). با توجه به اثبات غیر سمی بودن گلایسین و لیزین خوراکی در مطالعه حاضر، می‌توان از آن‌ها با اطمینان بیشتری در اهداف درمانی دیابت استفاده کرد و به عنوان گزینه‌ای برای جلوگیری از بروز و پیشرفت نفروپاتی دیابتی مورد بررسی قرار داد.

References

1. Rathmann W, Giani G. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(10): 2568-9.
2. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002; 346(15): 1145-51.
3. Stitt AW. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(6): 746-53.
4. Tan AL, Forbes JM, Cooper ME. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 2007; 27(2): 130-43.
5. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233(1): 4-11.
6. Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, et al. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(4): 779-90.
7. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(Suppl 1): S55-S57.
8. Thallas-Bonke V, Lindschau C, Rizkalla B, Bach LA, Boner G, Meier M, et al. Attenuation of extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy by the advanced glycation end product cross-link breaker ALT-711 via a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes* 2004; 53(11): 2921-30.
9. Zhu Y, Shu T, Lin Y, Wang H, Yang J, Shi Y, et al. Inhibition of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) protects pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404(1): 159-65.
10. Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, Paludan SR, et al. Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 2004; 53(1): 166-72.
11. Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, Kato I, Harashima A, Yonekura H, et al. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. *Diabetes* 2006; 55(9): 2510-22.
12. Gill PS, Wilcox CS. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(9-10): 1597-607.
13. Li JM, Shah AM. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(8 Suppl 3): S221-S226.
14. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(9): 1656-66.
15. Anuradha CV. Aminoacid support in the prevention of diabetes and diabetic complications. *Curr Protein Pept Sci* 2009; 10(1): 8-17.
16. Huang KH, Pai MH, Wu CH, Liu JJ, Yeh SL. Supplemental dietary arginine reduces renal RAGE expression and oxidative

damage in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes. *e-SPEN the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2010; 5(2): e77-e84.

17. Mahdavifard S, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Heidarzadeh H. l-cysteine is a potent inhibitor of protein glycation on both albumin and LDL, and prevents the diabetic complications in diabetic–atherosclerotic rat. *Food Research International* 2014; 62: 909-16.

18. Alvarado-Vasquez N, Zamudio P, Ceron E, Vanda B, Zenteno E, Carvajal-Sandoval G. Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003; 134(4): 521-7.

19. Bahmani F, Bathaie SZ, Aldavood SJ, Ghahghaei A. Glycine therapy inhibits the progression of cataract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Vis* 2012; 18: 439-48.

20. Jafarnejad A, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Hassan MZ, Banasadegh S. The improvement effect of L-Lys as a chemical chaperone on STZ-induced diabetic rats, protein structure and function. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24(1): 64-73.

21. Jyothirmayi GN, Modak R, Reddi AS. L-lysine reduces nonenzymatic glycation of glomerular basement membrane collagen and albuminuria in diabetic rats. *Nephron* 2001; 87(2): 148-54.

22. Bahmani F. Mechanisms of the effects of chemical chaperones on prevention of cataract in diabetic rats and their inhibitory effects on related-proteins' glycation [Thesis]. Tehran, Iran: Tarbiat Modares University 2012. [In Persian].

23. Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51(6): 597-604.

24. Ashrafi M, Bathaie SZ, Abroun S. High Expression of Cyclin D1 and p21 in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced Breast Cancer in Wistar Albino Female Rats. *Cell J* 2012; 14(3): 193-202.

25. Hoshyar R, Bathaie SZ, Sadeghizadeh M. Crocin triggers the apoptosis through increasing the Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in human gastric adenocarcinoma, AGS, cells. *DNA Cell Biol* 2013; 32(2): 50-7.

26. Jafarnejad A, Bathaie SZ, Nakhjavani M, Hassan MZ. Effect of spermine on lipid profile and HDL functionality in the streptozotocin-induced diabetic rat model. *Life Sci* 2008; 82(5-6): 301-7.

27. Arreortua Noe S, Mario GL, Reyes GD, Edgar Iván VJ, Francisco Javier AA, José Luis O. Effect of Glycine on Protein Oxidation and Advanced Glycation End Products Formation. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* 2013; 5(3): 109-14.

28. Ramakrishnan S, Sulochana KN, Punitham R. Two new functions of inositol in the eye lens: antioxidation and antiglycation and possible mechanisms. *Indian J Biochem Biophys* 1999; 36(2): 129-33.

29. Gonzalez-Ortiz M, Medina-Santillan R, Martinez-Abundis E, von Drateln CR. Effect of glycine on insulin secretion and action in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients. *Horm Metab Res* 2001; 33(6): 358-60.

30. Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. The metabolic response to ingested glycine. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(6): 1302-7.

31. Alvarado-Vasquez N, Lascurain R, Ceron E, Vanda B, Carvajal-Sandoval G, Tapia A, et al. Oral glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2006; 79(3): 225-32.

32. Youssef AI, Abou-Shamaa LA, Fadaly GA. Effect of Glycine and Vitamins on COX-2,TNF- andTGF-1 in CCl4 Induced Liver Fibrosis. *Journal of the Medical Research Institute* 2006; 27(3): 215-23.

33. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, et al. Attenuation of CCl(4)-induced hepatic fibrosis by GdCl(3) treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(1): G200-G207.

34. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18(7): 816-27.

35. Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, et al. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6(2): 229-40.

36. Ikejima K, Iimuro Y, Forman DT, Thurman RG. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol* 1996; 271(1 Pt 1): G97-103.

37. De CS, Earle K, Morocutti A, Walker J, Ruggenenti P, Remuzzi G, et al. Glucose-induced changes in renal haemodynamics in proteinuric type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: inhibition by acetylsalicilic acid infusion. *Diabetologia* 1993; 36(7): 622-7.

38. Mirmiranpour H, Bathaie SZ, Khaghani S, Nakhjavani M, Kebriaeezadeh A. Investigation of the mechanism(s) involved in decreasing increased fibrinogen activity in hyperglycemic conditions using L-lysine supplementation. *Thromb Res* 2012; 130(3): e13-e19.

39. Nakamura S, Li H, Adijiang A, Pischetsrieder M, Niwa T. Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(8): 2165-74.

40. Forbes JM, Thorpe SR, Thallas-Bonke V, Pete J, Thomas MC, Deemer ER, et al. Modulation of soluble receptor for advanced glycation end products by angiotensin-converting enzyme-1 inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(8): 2363-72.

41. Lu L, Peng WH, Wang W, Wang LJ, Chen QJ, Shen WF. Effects of atorvastatin on progression of diabetic nephropathy and local RAGE and soluble RAGE expressions in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011; 12(8): 652-9.

42. Hansen PA, Waheed A, Corbett JA. Chemically chaperoning the actions of insulin. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18(1): 1-3.

43. Chaudhuri TK, Paul S. Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches. *FEBS J* 2006; 273(7): 1331-49.

Assessment of Oral Glycine and Lysine Therapy on Receptor for Advanced Glycation End Products and Transforming Growth Factor Beta Expression in the Kidney of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats in Comparison with Normal Rats

Somayeh Sadat Heidary, M.Sc.[1], Sayedeh Zahra Bathaie, Ph.D.[2], Fereshteh Bahmani, Ph.D.[3], Gholamreza Moshtaghi Kashanian, Ph.D.[4*]

1. Department of Clinical Biochemistry, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2. Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Medical Sciences, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran
4. Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, Afzalipour School of Medicine & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: moshtaghik@kmu.ac.ir

(Received: 30 Dec. 2013 Accepted: 18 June 2014)

Abstract

Background & Aims: Today, diabetic nephropathy is considered to be one of the most common causes of end stage renal disease. Uncontrolled hyperglycemia, and consequently, production of advanced glycation end products activate pathways which play key roles in diabetic nephropathy. Among these pathways, high expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and transforming growth factor beta (TGFβ) are notable. In this study, in order to find compounds which can prevent the incidence or progression of diabetic nephropathy, we examined the effects of glycine and lysine amino acids on expression of RAGE and TGFβ in kidney tissue of diabetic rats.

Methods: After rendering rats with diabetes with streptozotocin (STZ), they were divided into different groups and were treated with oral 1% glycine and 0.1% lysine in drinking water for 12 weeks. Blood glucose and serum AGEs were measured during this time. Changes in RAGE and TGFβ expression were assessed by semi quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method.

Results: Results show that both glycine and lysine administration for 12 weeks not only caused a significant reduction in blood glucose and AGEs in diabetic rats, but also led to a significant reduction in RAGE and TGFβ expression in comparison to non-treated diabetic rats.

Conclusion: These results show that oral glycine and lysine, as chemical chaperones, have the ability to prevent diabetic nephropathy by decreasing RAGE and TGFβ expression. This may be due to the effect of these chemical chaperones in the reduction of hyperglycemia and serum AGEs in diabetic rats. Since the positive effects of these amino acids in diabetic nephropathy have been observed in previous studies, the determination of their dose in future studies seems necessary.

Keywords: Receptor for advanced glycation end products (RAGE), Advanced glycation end products (AGEs), Glycine, Lysine, Chemical chaperones

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2014; 21(6): 454-468