

# دانشور پزشکی

## ارزیابی تجویز آپجینین بر برخی از فاکتورهای مرتبط با استرس اکسیداتیو در بافت کلیه موش سفید بزرگ دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

نویسندگان: دکتر رضا افشار\*<sup>۱</sup>، دکتر مهرداد روغنی<sup>۲</sup>، فاطمه پوراسد مهربانی<sup>۳</sup>

۱- دانشیار - گروه داخلی و نفرولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران  
۲- استاد - گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۳- دانش آموخته دانشکده پزشکی - دانشگاه شاهد، تهران، ایران

R2afshar@yahoo.com

\* نویسنده مسئول:

### چکیده

مقدمه و هدف: دیابت قندی موجب افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت سیستم مقابله کننده با عوامل اکسیدانت در بدن می شود. با توجه به نقشی که تشدید استرس اکسیداتیو در آسیب به بافت کلیوی و نفروپاتی در حالت دیابت دارد و با در نظر گرفتن اثر ضد دیابتی و آنتی اکسیدانی آپجینین، هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی اثر تجویز مزمن این فلاونوئید بر سطح بافتی برخی شاخص های استرس اکسیداتیو در بافت کلیه موش سفید بزرگ دیابتی است.

مواد و روش ها: موش های سفید بزرگ نر به چهار گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با آپجینین، دیابتی و گروه دیابتی تحت درمان با آپجینین تقسیم شدند؛ آپجینین به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت سه هفته و از یک هفته پس از القای دیابت توسط استرپتوزوتوسین تجویز شد؛ در پایان کار، سطح بافتی مالون دی آلدئید و نیتريت و نیترات و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در بافت کلیه اندازه گیری شد.

نتایج: سطح مالون دی آلدئید و نیتريت و نیترات در بافت کلیوی موش های دیابتی افزایش معنادار (به ترتیب  $p < 0.01$  و  $p < 0.05$ ) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز کاهش معنی دار ( $p < 0.01$ ) را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند، ولی تیمار موش های دیابتی با آپجینین، سبب کاهش معنی دار سطح مالون دی آلدئید، کاهش معنی دار نیتريت و افزایش مورد انتظار معنی دار در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در مقایسه با گروه دیابتی نشد.

نتیجه گیری: تجویز مزمن آپجینین آثاری معنی دار بر شاخص های استرس اکسیداتیو اندازه گیری شده در این پژوهش در بافت کلیوی موش های دیابتی نداشت و مشخص شد که آثار آنتی اکسیدان این ترکیب در حدی نیست که بتواند از بروز آسیب های کلیوی در مدل القا دیابت توسط استرپتوزوتوسین جلوگیری کند.

واژگان کلیدی: آپجینین، دیابت قندی، استرس اکسیداتیو، کلیه

دوماهنامه علمی - پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیستم - شماره ۱۰۱  
آبان ۱۳۹۱

دریافت: ۹۱/۶/۱۸

آخرین اصلاح ها: ۹۱/۹/۱۸

پذیرش: ۹۱/۹/۱۹

## مقدمه

بیماری دیابت قندی، نوعی یک بیماری متابولیک با شیوع بالا در گروه بیماری‌های غدد درون‌ریز بدن محسوب می‌شود که از نظر میزان رخداد، روندی روبه‌رشد در جامعه انسانی نشان می‌دهد (۱)؛ این بیماری، گروهی از اختلال‌های متابولیک را دربرمی‌گیرد که وجه مشترک تمام آنها بالا رفتن سطح قند خون است. دیابت قندی بر اثر تعامل میان عوامل ژنتیکی، فاکتورهای محیطی و شیوه زندگی رخ می‌دهد. در میان عوارض ناشی از دیابت، نفروپاتی، شایع‌ترین علت نارسایی کلیه در دراز مدت به حساب می‌آید (۲)، بسیاری از بیماران مبتلا به نفروپاتی دیابتی بر اثر بیماری‌های قلبی و عروقی فوت می‌کنند (۳)؛ همچنین، در بیماران دیابتی، احتمال تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از فرم‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد و این عامل، فاکتوری مهم در ایجاد عوارض ناشی از دیابت مانند نفروپاتی، نوروپاتی، رتینوپاتی و بیماری‌های قلبی و عروقی به‌شمار می‌رود (۴)؛ در این خصوص، استرس اکسیداتیو با چند ساختار در ایجاد نفروپاتی دیابتی نقش دارد (۵).

آپیچنین یک فلاوون و آگلیکون مشتق از گلیکوزیدها محسوب می‌شود که در بسیاری از میوه‌ها به مقدار کم تا متوسط یافت می‌شود. نتایج تحقیق‌های پیشین نشان می‌دهند که این ماده، دارای خاصیت حفاظت سلول‌های بتا پانکراس در برابر آثار سمی استرپتوزوتوسین و پابین-آورنده قند خون است؛ همچنین، آثار حفاظتی آن در اندوتلیوم آئورت در برابر استرس اکسیداتیو و شل‌کنندگی عروقی آن پیش‌تر مورد تأیید قرار گرفته است (۶ تا ۱۳)؛ در این بررسی، اثر تجویز این فلاونوئید بر برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کلیه موش‌های سفید بزرگ دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین بررسی شد.

## مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی از ۳۲ سر موش سفید بزرگ نر نژاد ویستار (انستیتو پاستور، تهران) در محدوده وزنی ۲۲۰ تا ۳۱۰ گرم استفاده شد. تمام حیوانات در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های سه تا چهار تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوانات آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) به مدت شش هفته دسترسی داشتند؛ درضمن،

بررسی براساس پروتکل‌ها و دستورالعمل‌های توصیه‌شده توسط انستیتو ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و توصیه‌های اخلاقی مصوب دانشگاه شاهد (تهران، ایران) به‌انجام رسید؛ در این بررسی از آن دسته موش‌های سفید بزرگ نر استفاده شد که در شرایط طبیعی، میزان گلوکز سرم آنها کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود؛ در این خصوص از شبکه رترواوریتال و لوله موئینه برای خونگیری استفاده شد. حجم خون اخذ شده از هر حیوان نیز حدود ۱ میلی‌لیتر بود. موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل، دیابتی، کنترل تحت تیمار با آپیچنین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دیابتی و دیابتی تحت تیمار با آپیچنین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. دوز آپیچنین براساس آزمایش‌های پیلوت و رفرانس‌های موجود انتخاب شد. آپیچنین یک هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین به‌مدت سه هفته (داخل صفاقی) تجویز شد. برای دیابتی کردن موش‌ها، از داروی استرپتوزوتوسین (سیگما، آمریکا) به صورت تک‌دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل‌شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد؛ یک هفته پس از تزریق، برای اطمینان از دیابتی بودن حیوانات، قند ادرار به روش نوار ادراری (شرکت گلوکویاب، تهران) کنترل شد و فقط حیوانات دیابتی با میزان قند ادرار بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر که با میزان قند خون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر با در نظر گرفتن آستانه فیزیولوژیک ظهور قند در ادرار برابری می‌کند به مرحله بعدی برای شروع تیمار راه یافتند؛ درضمن، کاهش وزن در پایان کار در تمام موش‌های دیابتی شده دیده شد. تعیین میزان وزن حیوانات، پیش از انجام کار و طی هفته‌های دوم و چهارم پس از بررسی به‌انجام رسید؛ همچنین، اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران) با استفاده از اسپکتروفتومتر (اسپکترونیک ۲۰، آمریکا) انجام شد.

## سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA)

پس از پایان کار، بافت کلیه جدا می‌شود و پس از شستشو با محلول سالین سرد و خشک کردن به سرعت توزین شده، سپس بافت به همراه بافر تریس به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه (۱۰٪) شد و محلول هموژنیزه شده،

اکسیداز به عنوان تولیدکننده سوپراکسید است (۱۴)؛ در این آزمایش از محلول کاری شامل گزانتین، گزانتین اکسیداز در بافر پتاسیم فسفات و نیتروبلوترازولیوم استفاده شد؛ جذب نوری هر نمونه به مدت ۵ دقیقه هر ۳۰ ثانیه یکبار خوانده شد. برای به دست آوردن درصد مهار انجام شده توسط آنزیم SOD، داده‌های به دست آمده از فرمول مرتبط، بر اساس دستورالعمل کیت استفاده شد. با انطباق درصد مهار روی منحنی استاندارد، فعالیت آنزیم به دست آمد و فعالیت آن بر حسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

### آنالیز آماری

از نظر آماری، تمامی نتایج، به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند. پس از مشخص کردن توزیع داده‌ها، برای مقایسه نتایج هر مؤلفه در هریک از گروه‌ها پیش و بعد از بررسی از آزمون آنووا با اندازه‌گیری مکرر و برای مقایسه گروه‌ها با هم در هریک از پرودهای زمانی از آزمون آنووا یک‌طرفه و پست تست توکی استفاده شد؛ به علاوه سطح معنی‌دار،  $p < 0.05$  برای تمامی آنالیزها در نظر گرفته شد.

### نتایج

وزن حیوانات در هفته پیش از بررسی و هفته‌های دوم و چهارم پس از بررسی در تمام گروه‌ها اندازه‌گیری شد؛ نتایج به دست آمده نشان داد که میزان وزن در هفته پیش از بررسی، تفاوتی معنی‌دار میان گروه‌ها نشان نمی‌دهد، در حالی که طی هفته‌های دوم و چهارم، تفاوت معنی‌دار میان گروه‌ها مشاهده شد؛ در این خصوص، در هفته چهارم، گروه دیابتی، کاهش بارز و معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) را در حد متوسط در مقایسه با هفته پیشین کار نشان داد؛ همچنین، هرچند در هفته دوم نیز این کاهش وجود داشت تفاوت موجود به سطح معنی‌دار نرسید؛ همچنین، تفاوت موجود میان دو گروه دیابتی و دیابتی تحت درمان با آپیچنین نیز در هفته‌های دوم و چهارم در حد معنی‌دار نبود؛ از سوی دیگر، تیمار گروه کنترل با آپیچنین در همین هفته‌ها تغییر معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل تیمار نشده ایجاد نکرد؛ هرچند میزان وزن در حد مختصر از گروه کنترل کمتر بود؛ البته در گروه دیابتی در هفته چهارم، اندازه‌گیری وزن حاکی از کاهش معنی‌دار به میزان متوسط ( $p < 0.01$ ) نسبت به

سانتریفوژ شد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تمام این مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد؛ سپس، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا شده، بخش زیرین رسوب کرده دور ریخته شد و از محلول شفاف رویی برای سنجش استفاده شد. اندازه‌گیری سطح مالون دی‌آلدئید MDA بر اساس روشی است که اساس آن، واکنش تیوباربیتریک اسید TBA است که در دمای جوش انجام می‌گیرد (۱۴). در این آزمایش، مالون دی‌آلدئید یا مواد شبه‌مالون دی‌آلدئید با تیوباربیتریک اسید واکنش داده، رنگ صورتی ایجاد می‌کند که ماکزیمم جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر است؛ این واکنش در  $PH = 2-3$  و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸۰ دقیقه انجام شد. بعد از سرد کردن نمونه، جذب نوری در طول موج 532 nm در دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد؛ منحنی استاندارد نیز بر اساس رقت‌های تتراتوکسی پروپان تهیه شد.

### سنجش میزان پروتئین

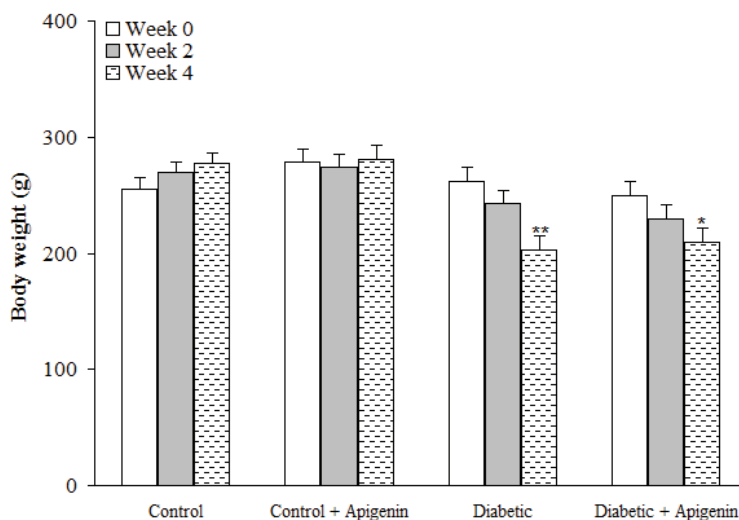
سنجش پروتئین به روش برادفورد انجام گرفت (۱۵)؛ در این روش، ابتدا معرف مرتبط تهیه شد؛ برای تهیه این معرف، ۲۵ میلی‌گرم کوماسی بلو در ۱۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد؛ سپس ۲۵ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد اضافه شد؛ هنگامی که رنگ حل شد حجم آن به ۱ لیتر رسانده شد و از کاغذ صافی عبور داده شد؛ برای تهیه محلول استاندارد نیز از آلبومین سرم گاوی استفاده شد؛ جذب نوری نمونه‌ها در طول موج 595 nm خوانده شد.

### سنجش میزان نیتريت

به دلیل اینکه سنجش مستقیم نیتريك اکساید در بافت‌های زنده مشکل است، میزان نیتريت و نیترات به عنوان شاخص نیتريك اکساید محسوب می‌شود (۱۴). محلول کاری شامل سولفانیل آمید ۱ درصد، نفتیلن اتیلن دی‌آمید دی‌هیدروکلرید ۰/۱ درصد و ارتوفسفریک اسید ۲/۵ درصد بود. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد و برای منحنی استاندارد از رقت‌های مختلف نیتريت سدیم استفاده شد.

سنجش میزان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اساس این اندازه‌گیری بر مهار احیای نیتروبلوترازولیوم توسط سیستم گزانتین-گزانتین

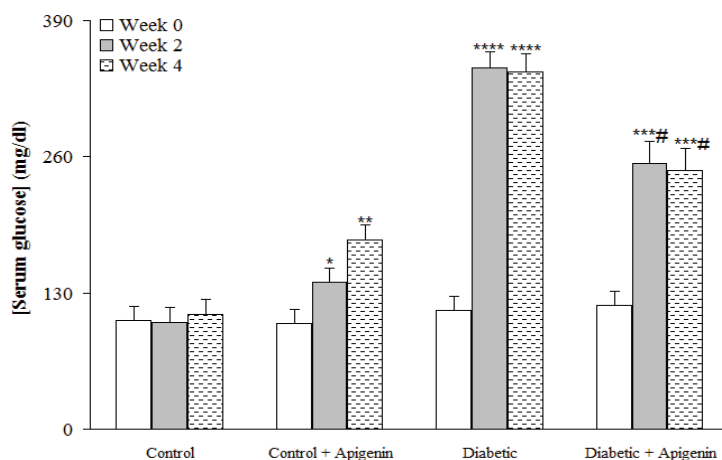
اندازه‌گیری اولیه بود و در گروه دیابتی تیمار شده نیز این کاهش وزن به‌طور معنی‌دار و به میزان کم ( $p < 0/05$ ) نسبت به وضعیت پایه مشاهده شد (نمودار ۱).



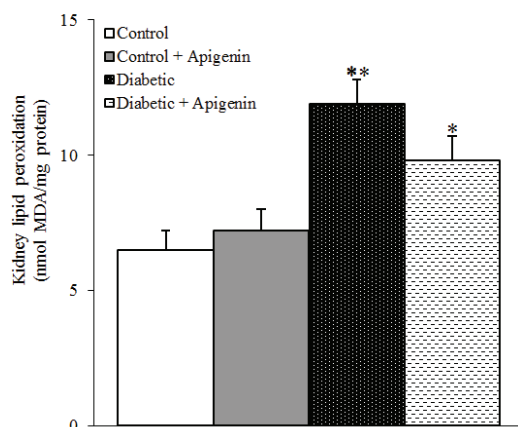
نمودار ۱. تغییرهای وزن در هفته‌های مختلف در موش‌های سفید بزرگ کنترل و دیابتی تیمار شده با آپیجین \*  $p < 0/05$ ، (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)  $p < 0/01$

با اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم در هفته‌های پیش از بررسی و دوم و چهارم پس از بررسی در تمام گروه‌ها مشخص شد که در هفته پیش از بررسی، تفاوت معنی‌دار، میان گروه‌ها یافت نمی‌شود؛ به‌علاوه، در گروه کنترل تیمار شده با آپیجین افزایش معنی‌دار میزان گلوکز در هفته‌های دوم و چهارم (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده شد  $p < 0/01$ ) در هفته‌های دوم و چهارم مشاهده شد؛ همچنین در گروه دیابتیک تحت تیمار با آپیجین نیز افزایش معنی‌دار ( $p < 0/005$ ) در هفته‌های دوم و چهارم ثبت شد؛ از طرفی، تیمار با آپیجین، سبب کاهش معنی‌دار گلوکز پلاسما در هفته‌های دوم و چهارم (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده شد (نمودار ۲).

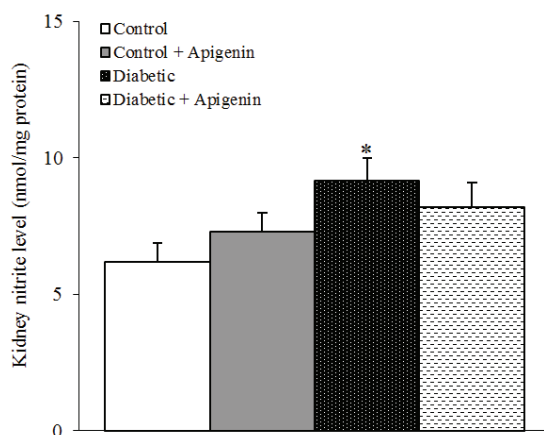
نمودار ۲. تغییرهای گلوکز سرم در هفته‌های مختلف در موش‌های سفید بزرگ کنترل و دیابتی تیمار شده با آپیجین \*  $p < 0/05$ ،  $p < 0/01$  \*\*،  $p < 0/005$  \*\*\*\*، (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، #  $p < 0/01$  (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان هفته)



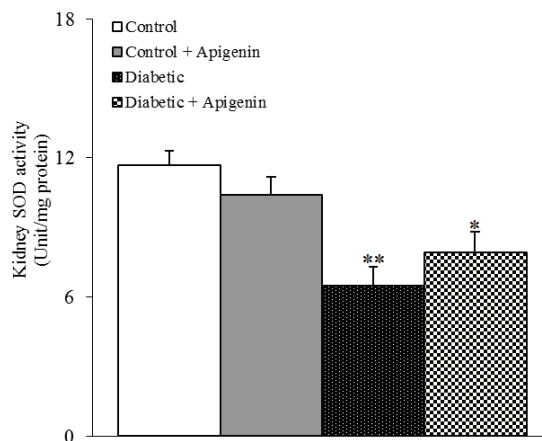
نمودار ۲. تغییرهای گلوکز سرم در هفته‌های مختلف در موش‌های سفید بزرگ کنترل و دیابتی تیمار شده با آپیجین \*  $p < 0/05$ ،  $p < 0/01$  \*\*،  $p < 0/005$  \*\*\*\*، (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، #  $p < 0/01$  (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان هفته)



نمودار ۳. میزان مالون دی آلدئید بافت کلیه در موش‌های سفید بزرگ کنترل و دیابتی تیمار شده با آپیجنین (در مقایسه با گروه کنترل)  $p < 0.01^{**}$ ،  $p < 0.05^*$



نمودار ۴. میزان نیتريت بافت کلیه در موش‌های سفید بزرگ کنترل و دیابتی تیمار شده با آپیجنین (در مقایسه با گروه کنترل)  $p < 0.05^*$



نمودار ۵. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در بافت کلیه در موش‌های سفید بزرگ کنترل و دیابتی تیمار شده با آپیجنین (در مقایسه با گروه کنترل)  $p < 0.01^{**}$ ،  $p < 0.05^*$

تیمارنشده غیرمعنادار بوده هرچند فعالیت آنزیم در گروه دیابتی تیمار شده به میزان ۲۱/۵ درصد بیشتر بود.

#### بحث

نتایج این بررسی نشان داد که موش‌های دیابتی یک افزایش معنادار در سطح بافتی مالون دی آلدئید ( $p < 0/01$ ) و نیتريت و نترات ( $p < 0/05$ ) و کاهش معنی-دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز ( $p < 0/01$ ) نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند و درمان موش‌های دیابتی با آپیجین سطح مالون دی آلدئید را به‌طور معنی-دار کاهش نداد؛ از نظر نیتريت نیز آپیجین موفق به کاهش معنی‌دار آن در موش‌های دیابتی نشد؛ از طرف-دیگر، تیمار موش‌های دیابتی با آپیجین نیز موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در مقایسه با گروه دیابتی نشد. از نظر وزن نیز، این فلاونوئید قادر به جلوگیری از کاهش معنی‌دار وزن در موش‌های دیابتی نشد هرچند که تجویز آن، قادر به کاهش معنی‌دار قند خون شد.

نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد که به‌طور کلی در حالت دیابت قندی شامل نوع ۱ و ۲، استرس اکسیداتیو به دلیل تشدید ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن و به-صورت افزایش سطح بافتی و سرمی مالون دی آلدئید افزایش می‌یابد و سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی از-جمله آنزیم سوپراکسید دیس موتاز کاهش فعالیت نشان می‌دهند که این تغییرها مسئول بخشی از آسیب‌های بافتی در حالت دیابت هستند (۲) که این تاحدودی در بررسی حاضر نیز به‌دست آمد؛ در این خصوص مشخص شده است که القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت توسط ترکیب‌های طبیعی، اقدامی مهم برای حفاظت سلول‌ها در مقابل انواع مختلف ترکیب‌های سمی درونی و بیرونی از قبیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن محسوب می‌شود (۴) و دیابت القاشده با استرپتوزوتوسین با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اندوژن می‌تواند موجب تشدید آسیب بافتی شود (۴). کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در موش‌های دیابتی در این بررسی مشاهده شد که ممکن است به دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپید و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که این با نتایج بررسی‌های پیشین مطابقت دارد (۱۶)؛ در این خصوص، به‌دنبال بروز دیابت

نمودار ۳، نتایج مربوط به اندازه‌گیری سطح مالون-دی آلدئید به‌عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو را در هموزنه بافت کلیه حیوانات تحت بررسی نشان می‌دهد. تجویز آپیجین در حیوانات گروه کنترل، تغییری معنادار و قابل‌ملاحظه را در سطح مالون‌دی آلدئید ایجاد نکرد و نوعی افزایش معنی‌دار سطح مالون‌دی آلدئید به میزان ۸۳ درصد در گروه دیابتی، نسبت به گروه کنترل ( $p < 0.01$ ) و افزایشی معنادار به میزان ۵۰/۸ درصد در گروه دیابتی تیمار شده با آپیجین ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت؛ به‌علاوه، سطح مالون‌دی آلدئید هموزنه کلیه گروه دیابتی تحت تیمار با آپیجین نیز تفاوتی معنادار نسبت به گروه دیابتی تیمارنشده نشان‌داد هرچند تفاوت موجود، حاکی از کاهش ۱۷/۶ درصدی میزان مالون‌دی-آلدئید در گروه دیابتی تحت تیمار در مقایسه با گروه دیابتی بود.

نمودار ۴ نتایج مربوط به اندازه‌گیری نیتريت را در هموزنه بافت کلیه حیوانات گروه‌های مختلف نشان می-دهد، همان‌طور که مشاهده می‌شود سطح نیتريت در گروه کنترل تیمار شده با آپیجین در پایان چهار هفته به‌صورت غیرمعنی‌دار و به میزان ۱۷/۷ درصد بیشتر از گروه کنترل تیمار نشده بود؛ به‌علاوه، افزایشی معنادار در سطح نیتريت در گروه دیابتی تیمار نشده به میزان ۴۸/۴ درصد نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P < 0.05$ )؛ همچنین در گروه دیابتی تیمار شده با آپیجین سطح نیتريت به‌صورت غیرمعنی‌دار به میزان ۱۰/۸ درصد نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده کمتر بود.

نمودار شماره ۵، نتایج مربوط به اندازه‌گیری سطح فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز به‌عنوان یک آنزیم حفاظتی در هموزنه بافت کلیه حیوانات گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد؛ همان‌طور که مشاهده می‌شود، سطح آنزیم به‌طور غیرمعنادار و به میزان ۱۱/۱ درصد در گروه کنترل تیمار شده با آپیجین کمتر از گروه کنترل تیمار نشده بود؛ فعالیت این آنزیم در گروه دیابتی تیمار نشده، کاهش بارز و معنی‌دار را به میزان ۴۴/۴ درصد نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.01$ ) که این کاهش در گروه دیابتی تیمار شده با آپیجین کمتر و در حد ۳۲/۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل بود ( $P < 0.05$ )؛ همچنین تفاوت سطح آنزیم در دو گروه دیابتی تیمار شده و دیابتی

فلاونوئیدها نظیر آپیجین در بافت کبد به طور مستقیم، موجب بهبود متابولیسم گلیکوژن در موش‌های سفید بزرگ دیابتی می‌شوند و جذب سلولی گلوکز را توسط بافت چربی تحریک می‌کنند (۲۰)؛ همچنین، درخصوص اثر هیپوگلیسمیک آپیجین نیز مشخص شده است که این فلاونوئید قادر به تحریک برداشت گلوکز در نواحی بافتی در موش‌های دیابتی شده است و البته می‌تواند ترشح انسولین را پس از درمان خوراکی در موش‌های هیپوگلیسمیک تحریک کند؛ به علاوه احتمال داده شده که بخشی از آثار سودمند آپیجین بر قند خون به دلیل اثرهای شبه‌انسولینی آن در دو بافت کبد و چربی باشد (۲۱) که این ساختارها به احتمال، تاحدودی در تحقیق حاضر رخ داده است؛ البته لازم به اشاره است که این فلاونوئید در دوزها و برنامه زمانی تجویز شده، اثری هیپوگلیسمیک در حد کم در موش‌های دیابتی شده اعمال کرده و شاید به همین دلیل، این فلاونوئید قادر به جلوگیری از کاهش وزن در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین در حد معنی‌دار نشده است. برخلاف اثر آنتی‌هیپوگلیسمیک اعمال شده از طرف آپیجین در موش‌های دیابتی، تجویز این فلاونوئید به موش‌های کنترل برخلاف انتظار، موجب افزایش قند خون و اعمال اثری هیپوگلیسمیک در حد متوسط شد. در توجیه این اثر مشخص شده که برخی فلاونوئیدها نظیر آپیجین در حالت نرمال ممکن است موجب افزایش مقاومت بافتی به انسولین و حتی کاهش ترشح انسولین از سلول‌های بتا شوند (۲۲) که این به احتمال در بررسی حاضر رخ داده است هرچند خود به مطالعات بیشتر نیاز دارد.

از محدودیت‌های بررسی حاضر نیز می‌توان به نبود ارزیابی بافت‌شناسی کلیه موش‌های دیابتی به دنبال تجویز آپیجین و بررسی شاخص‌های اداری مرتبط با عملکرد کلیه اشاره کرد که انجام این موارد در مطالعات بعدی توصیه می‌شود.

به طور خلاصه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تجویز تحت حاد آپیجین هرچند دارای اثر پایین‌آوردگی قند خون است، اثر مطلوب و معنی‌دار بر برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کلیه موش‌های سفید بزرگ دیابتی ندارد و به احتمال در جلوگیری از بروز آسیب کلیوی در دیابت نمی‌تواند مؤثر باشد.

با گذشت زمان، میزان پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این خود را با بالا رفتن سطح برخی نشانگرها نشان می‌دهد که از بهترین آنها، مالون دی آلدئید و نیتريت و نترات قابل اشاره‌اند (۱۷).

با توجه به اینکه استرس اکسیداتیو به دلیل تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن است و این مواد به دنبال کامل کردن مدار الکترونی خود هستند، مواد تشکیل‌دهنده سلول از جمله ساختارهای پروتئینی و لیپیدی آسیب می‌بینند که این با تغییرهای سطح آنزیم‌های بافتی، نظیر کاهش سوپراکسید دیس موتاز خود را نشان می‌دهد (۱۸)؛ در این بررسی، تجویز فلاونوئید آپیجین، موجب کاهش معنی‌دار سطح مارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت کلیه نشد. هرچند آثار سودمند این فلاونوئید به صورت آثار کاهش‌دهندگی استرس اکسیداتیو به دلیل دارا بودن خاصیت آنتی-اکسیداتیو و تقویت‌کنندگی سیستم حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن نشان داده شده، تجویز آن در این بررسی، موفق به کاهش معنی‌دار شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی نشد که یک دلیل آن، شاید تفاوت در میزان دوز و برنامه زمانی تجویز و نوع دیابت می‌تواند باشد که در یک مطالعه به عنوان نمونه دیابت توسط آلوکسان ایجاد شده بود (۸).

به علاوه، تجویز فلاونوئید آپیجین به موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین در این تحقیق، دارای اثر کاهنده قند خون بود که نتایجی به طور تقریبی، مشابه نیز پیش‌تر در این خصوص گزارش شده است؛ در این زمینه، نتایج مطالعات گذشته نشان داده‌اند که چنین فلاونوئیدهایی قادر به افزایش حساسیت بافتی به هورمون انسولین در موش‌های سفید بزرگ هستند و موجب بهبود عملکرد در تست تحمل داخل وریدی گلوکز می‌شوند که در اینجا تشدید مسیرهای سیگنالینگ پست رسپتوری انسولین در بافت عضلانی نقشی مهم ایفا می‌کند؛ حتی توسط برخی محققان ادعا شده است که آپیجین در موش‌های دیابتی شده می‌تواند برداشت گلوکز توسط دو بافت عضلانی و کبدی را در موش سفید بزرگ دیابتی شده با استرپتوزوتوسین را افزایش دهد که این می‌تواند به طور مؤثر در جهت کاهش قند خون عمل کند (۱۹)؛ به علاوه مشخص شده که

## تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر، حاصل پایان‌نامه دانشجویی مصوب معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد (تهران) در سال ۱۳۹۰ است و با حمایت مالی این دانشگاه به‌انجام رسیده‌است که بدین‌وسیله قدردانی می‌-

کنیم؛ درضمن، نویسندگان مقاله، مراتب تشکر وافر خود را از سرکار خانم فریبا انصاری، کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد در کمک به انجام آزمایش‌ها اعلام می‌کنند.

## منابع

1. Leahy JL. Insulin therapy in type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2012; 41: 119-44.
2. Lehman R, Gerber PA. End-stage nephropathy in type 1-diabetes mellitus - kidney transplantation alone or combined with islet or pancreas transplantation?. *Ther Umsch.* 2011;68:699-706.
3. Carpenter CH, Gringgs R, Loscalzo J. Cecil Essential of internal medicine, 6<sup>th</sup> edition, Saunders Company, 2004.
4. Nair M. Diabetes mellitus. Part 1: physiology and complications. *Br J Nurs.* 2007; 16: 184-8.
5. International Diabetes Federation, International Society of Nephrology. Diabetes and Kidney disease: Time to Act. Brussels: International Diabetes Federation; 2003: 15-45.
6. Yamagata K, Miyashita A, Matsufuji H, Chino M. Dietary flavonoid apigenin inhibits high glucose and tumor necrosis factor alpha-induced adhesion molecule expression in human endothelial cells. *J Nutr Biochem.* 2010; 21:116-24.
7. Cazarolli LH, Folador P, Moresco HH, Brighente IM, Pizzolatti MG, Silva FR. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C- (2''-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on 14C-glucose uptake. *Chem Biol Interact.* 2009; 179 (2-3):407-12.
8. Panda S, Kar A. Apigenin(4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59 (11):1543-8.
9. Sui H, Yu Q, Zhi Y, Geng G, Liu H, Xu H. Effects of apigenin on the expression of angiotensin-converting enzyme 2 in kidney in spontaneously hypertensive rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2010; 39 (6):693-6.
10. Singh JP, Selvendiran K, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D. Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine.* 2004; 11: 309-14.
11. Jin BH, Qian LB, Chen S, Li J, Wang HP, Bruce IC, Lin J, Xia Q. Apigenin protects endothelium-dependent relaxation of rat aorta against oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2009; 616: 200-5.
12. Ma X, Li YF, Gao Q, Ye ZG, Lu XJ, Wang HP, Jiang HD, Bruce IC, Xia Q. Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 2008 Jul 18;83: 110-7.
13. Kim TJ, Zhang YH, Kim Y, Lee CK, Lee MK, Hong JT, Yun YP. Effects of apigenin on the serum- and platelet derived growth factor-BB-induced proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cells. *Planta Med.* 2002; 68:605-9.
14. Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Chronic epigallocatechin-3-gallate ameliorates learning and memory deficits in diabetic rats via modulation of nitric oxide and oxidative stress. *Behav Brain Res.* 2011; 224: 305-10.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
16. Naudi A, Jove M, Ayala V, Cassanye A, Serrano J, Gonzalo H, Boada J, Prat J, Portero-Otin M, Pamplona R. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 696215.
17. Victor VM, Rocha M, Herance R, Hernandez-Mijares A. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes. *Curr Pharm Des.* 2011;17: 3947-58.
18. Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49: 1773-82.
19. Cazarolli LH, Folador P, Moresco HH, Brighente IM, Pizzolatti MG, Silva FR. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2''-O-alpha-l-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on 14C-glucose uptake. *Chem Biol Interact.* 2009; 179: 407-12.
20. Cazarolli LH, Folador P, Moresco HH, Brighente IM, Pizzolatti MG, Silva FR. stimulatory effect of apigenin-6-C-beta-L-fucopyranoside on insulin secretion and glycogen synthesis. *Eur J Med Chem.* 2009; 44: 4668-73
21. Cazarolli LH, Kappel VD, Pereira DF, Moresco HH, Brighente IM, Pizzolatti MG, Silva FR. Anti-hyperglycemic action of apigenin-6-C-beta-fucopyranoside from *Averrhoa carambola*. *Fitoterapia.* 2012; 83: 1176-83.
22. Song Y, Manson JE, Buring JE, Sesso HD, Liu S. Associations of dietary flavonoids with risk of type 2 diabetes, and markers of insulin resistance and systemic inflammation in women: a prospective study and cross-sectional analysis. *Am Coll Nutr.* 2005; 24: 376-84.