

اثرهای حفاظتی بیوکائین آبرکبد و کلیه موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت

نویسندگان: رضا عزیزی^۱، محمدتقی گودرزی^۲، زهرا سالمی^{۳*}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

۲. استاد مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان، ایران

۳. استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

E-mail: Dr.zsalemi@arakmu.ac.ir

* نویسنده مسئول: زهرا سالمی

چکیده

مقدمه و هدف: ترکیب ایزوفلاونوئیدی بیوکائین آ موجود در شبدر قرمز و دانه سویا در درمان دیابت و کاهش لیپیدها مؤثر است. در این مطالعه، آثار کبدی و کلیوی بیوکائین آ در موش‌های صحرایی بررسی شد که با استفاده از استرپتوزوسین (STZ) به دیابت خفیف، مبتلا شده‌اند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، موش‌های صحرایی نژاد ویستار با تزریق صفاقی استرپتوزوسین (۳۵ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن) دیابتی شدند. دوزهای ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از بیوکائین آ در دی متیل سولفوکسید ۵ درصد با روش گاواژ به مدت سی روز به موش‌های مبتلا به دیابت خفیف، برای درمان تجویز شد. وزن حیوانات و عوامل بیوشیمیایی، مانند قند خون ناشتا، هموگلوبین گلیکوزیله، پروفایل لیپیدی، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) برای بررسی عملکرد کبد، اوره و کراتینین سرم به منظور بررسی عملکرد کلیه اندازه‌گیری شدند.

نتایج: تجویز بیوکائین آ، موجب کاهش و برگشت به میزان طبیعی وزن و سایر عوامل بیوشیمیایی، مانند قند خون ناشتا، هموگلوبین گلیکوزیله و پروفایل لیپیدی شد که بر اثر دیابتی شدن افزایش یافته بود؛ همچنین مصرف بیوکائین آ، باعث کاهش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی، اوره و کراتینین نسبت به گروه کنترل دیابتی شد؛ آثار حفاظتی بیوکائین آ در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، معنی‌دارتر از ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

نتیجه‌گیری: مصرف بیوکائین آ، علاوه بر آثار آنتی‌دیابتی و کاهش لیپیدها، روی بافت کبد و کلیه، اثر حفاظتی دارد و عدم سمیت کبدی و کلیوی این ترکیب در دوزهای یادشده اثبات شد.

واژگان کلیدی: بیوکائین آ، کلیه، کبد، موش صحرایی

دانشور

پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ویکم-شماره ۱۰۹
اسفند ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۹/۹

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۱۱/۳

پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۸

مقدمه

صحرایی مبتلا به دیابت خفیف، میزان سمیت کبدی و کلیوی این ترکیب با اندازه‌گیری مؤلفه‌هایی مانند آنزیم‌های کبدی AST، ALP، ALT، اوره و کراتینین در سرم مورد ارزیابی قرار گرفت، تا در صورت اطمینان از عدم سمیت بتوانیم مصرف آن را به‌عنوان یک داروی گیاهی ضددیابتی به بیماران دیابتی توصیه کنیم.

مواد و روش‌ها

معرف‌ها و مواد شیمیایی

STZ و بیوکائین آ از شرکت سیگما آلدریج (آمریکا) خریداری شد؛ سایر مواد شیمیایی که در این مطالعه استفاده شدند از شرکت مرک (آلمان) با درجه آنالیتیکال خریداری شدند. کیت‌های اندازه‌گیری قند خون، کلسترول تام، HDL-c و تریگلیسرید، اوره و کراتینین از شرکت پارس‌آزمون (ایران، تهران) خریداری شدند. LDL-c طبق فرمول فریدوال محاسبه شد.

$$\text{LDL cholesterol} = \text{total cholesterol} - \frac{[\text{HDL-C} + (\text{triglycerides}/5)]}{2}$$

فعالیت آنزیم‌های سرمی AST، ALT، ALP با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و کیت تشخیصی خریداری شده از شرکت پارس‌آزمون (ایران، تهران) اندازه‌گیری شد. HbA1c با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی و کیت Biosystems kit (اسپانیا) اندازه‌گیری شد.

حیوانات

موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۱۶۰ تا ۱۸۰ گرم) از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تهران خریداری شده، در اتاق دارای تهویه و دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد با چرخه ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. غذای تجارتنی طبیعی مخصوص حیوانات آزمایشگاهی به‌طور آزادانه در دسترس حیوانات قرار داشت. روش کار با حیوانات، مطابق با روش‌های استاندارد، معتبر و مورد تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد.

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیک است که در طول تاریخ، در تمام دنیا وجود داشته است (۱)؛ این بیماری با هیپرگلیسمی ناشی از نقص در ترشح انسولین یا عملکرد انسولین یا هر دو با هم همراه است. عوارض بلندمدت دیابت، شامل بیماری قلبی، سکته مغزی و بیماری‌های عروق محیطی است که می‌تواند به زخم، گانگرن و قطع عضو منجر شود (۲). اگرچه داروهای کنونی (انسولین، سولفونیل اوره‌ها، بایگوانیدها و تiazolidin دیون‌ها) در کنترل دیابت مفیدند، اغلب، مصرف این داروها در درازمدت با عوارض جانبی، مانند هیپوگلیسمی، مقاومت دارویی و افزایش وزن همراه اند (۳). برخی گونه‌های گیاهی دارای خاصیت درمانی دیابت، عوارض جانبی ندارند یا عوارضی بسیار ناچیز دارند (۴). تاکنون حدود هشتصد گیاه آنتی‌دیابتیک شناسایی شده‌اند (۵)؛ در این میان، بیوفلاونوئیدها، اهمیتی ویژه دارند. با استفاده از روش‌های مختلف، اثر کاهش‌دهندگی قند خون ناشی از مصرف بیوفلاونوئیدها به‌اثبات رسیده است؛ برای نمونه، بیوفلاونوئیدها می‌توانند محرک ترشح انسولین یا تقلیدکننده اثر انسولین باشند؛ لذا ناهنجاری‌های ناشی از دیابت را بهبودمی‌بخشند. بیوفلاونوئیدها در بافت‌های محیطی، سبب تحریک برداشت گلوکز می‌شوند و بیان ژن یا فعالیت آنزیم‌های کلیدی مسیرهای متابولیسم کربوهیدرات‌ها را تنظیم می‌کنند (۶). ایزوفلاونوئید بیوکائین آ، یکی از ترکیب‌های فیتوشیمیایی موجود در شبدر قرمز، کلم و یونجه است که روی متابولیسم بنزوپیرن‌ها، اثر مهارکنندگی دارد (۷)، از تولید Nیتیر و Nمتیل اوره توسط تومورهای پستان در رت‌ها جلوگیری می‌کند (۸) و مهارکننده توپوایزومراز II است (۹)؛ آثار فارماکولوژیک این ترکیب، مانند اثر ضدالتهایی، ضدسرطانی و آثار هیپولیپیدمیک آن نشان داده است. در این مطالعه، ضمن بررسی آثار آنتی‌دیابتیک و آنتی‌لیپیدمیک بیوکائین آ در موش‌های

القای دیابت

STZ به صورت تازه در بافر سترات با $pH=4/5$ تهیه شد و بی درنگ به صورت داخل صفاقی با دوز ۳۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد (پس از یک شب ناشتایی). به گروه کنترل سالم، فقط بافر سترات با همان حجم به عنوان دارونما تزریق شد. سه روز پس از تزریق، قند خون ناشتا در همه موش ها اندازه گیری شد و قند خون ناشتا، بالای ۱۲۶ میلی گرم بر دسی لیتر به عنوان معیاری برای ابتلا به دیابت در نظر گرفته شد.

روش کار

در این مطالعه، تعداد ۲۴ موش (۶ عدد نرمال و ۱۸ عدد دیابتی) استفاده شدند که به چهار گروه شش تایی تقسیم شدند. بیوکائین آ در ۰/۵٪ DMSO به صورت سوسپانسیون در آمد و به صورت خوراکی با روش گاواژ روزانه یک بار و در ساعت ۹ صبح به موش ها داده شد. و گروه های کنترل فقط ۰/۵٪ DMSO دریافت کردند. گروه های مورد مطالعه به این شکل طبقه بندی شدند:

- گروه ۱. کنترل سالم (دریافت ۰/۵٪ DMSO)؛
- گروه ۲. کنترل دیابتی (دریافت ۰/۵٪ DMSO)؛
- گروه ۳. دیابتی+بیوکائین آ (غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)؛
- گروه ۴. دیابتی+بیوکائین آ (غلظت ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم).

در ابتدا و انتهای کار، همه موش ها توزین شدند و قند خون ناشتای تمامی گروه ها اندازه گیری و ثبت شد. در پایان کار، پس از یک شب ناشتایی، همه حیوانات با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بیهوش شدند و نمونه خون از قلب آنها جمع آوری و سرم، فوری، جدا شد.

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا با استفاده از آزمون One Sample Kolmogorov-

Smirnov نرمالیتی متغیرها به تفکیک چهار گروه تحت مطالعه بررسی شد و با توجه به نتایج حاصل از این بررسی که نشان دهنده نرمال بودن تمامی متغیرها بود، با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، میانگین متغیرها در میان چهار گروه تحت مطالعه سنجیده شد و در مواردی که آزمون ANOVA، اختلافی معنی دار میان گروه ها نشان می داد با استفاده از آزمون تکمیلی پست هاک توکی، میانگین گروه ها به صورت دوجه دو مقایسه شد $P<0.05$. به عنوان سطح معنی دار بودن نتایج تجزیه و تحلیل در نظر گرفته شد.

نتایج

جدول ۱، وضعیت دیابتی شدن موش ها را پس از تزریق STZ و نیز اثر بیوکائین آ بر تغییرهای قند خون ناشتا، HbA1c و پروفایل لیپیدی در هر چهار گروه به تفکیک نشان می دهد. سطح گلوکز سرم در روز صفر و نیز در روز سی ام سنجیده شد؛ سه روز پس از تزریق STZ، رت های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم افزایشی چشمگیر ($p<0.05$) در میزان قند خون نشان دادند (این روز به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد). رت هایی با قند خون ناشتای بالای ۱۲۶ میلی گرم بر دسی لیتر، به عنوان رت های دیابتی انتخاب شدند. درمان با بیوکائین آ در دو دوز مختلف به مدت سی روز ادامه یافت.

نتایج حاصل، کاهش معنی دار وزن رت های دیابتی را نسبت به گروه کنترل سالم نشان دادند ولی تجویز بیوکائین آ با دو دوز مختلف، پس از سی روز، وزن آنها را بهبود بخشید و به میزان گروه سالم نزدیک کرد؛ HbA1c در رت های دیابتی نیز، افزایشی معنی دار یافت ($p<0.05$) که پس از درمان با بیوکائین آ، مقادیر آن نیز به نزدیک مقادیر طبیعی کاهش یافت؛ اما به هر حال، HbA1c در مقایسه با گروه کنترل سالم به طور کامل کاهش نیافت. در هر دو مورد بالا، بیوکائین آ در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم مؤثرتر از دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم بود.

LDL-c در گروه دیابتی در مقایسه با گروه سالم، کاهش و HDL-c افزایش معنی‌دار نشان‌داد؛ اما در گروهی که بیوکائین آ با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مصرف‌شده‌بود، تغییرهایی قابل‌ملاحظه در پروفایل لیپید مشاهده‌نشد.

در رت‌های دیابتی در مقایسه با رت‌های سالم HDL-c کاهش ($p < 0.05$) و تری‌گلیسرید افزایشی معنی‌دار ($p < 0.05$) داشت؛ اما کلسترول تام و LDL-c، افزایشی ناچیز را نشان‌دادند. استفاده از دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیوکائین آ پروفایل لیپید را به مقادیر نرمال نزدیک‌کرد؛ در این دوز، مقادیر کلسترول تام، TG و

جدول ۱. تأثیر بیوکائین آ بر وزن، قندخون و پروفایل لیپید در موش‌های صحرایی دیابتی

HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	تری‌گلیسرید (mg/dl)	کلسترول تام (mg/dl)	HbA1c (%)	وزن (g)		میزان گلوکز خون (mg/dl)		گروه
					روز صفر	روز ۳۰	روز صفر	روز ۳۰	
۳۶/۱۷±۲/۴۸	۴۹/۳۰±۸/۴	۸۴/۳۳±۱/۷۵	۱۰۲/۳±۹/۶۴	۵/۱۹±۰/۲۲	۶/۵±۲۱۰/۸	۱۸۹/۳±۳/۲	۶۱±۳/۵	۶۸±۳/۴	سالم
۳۰/۱۷± ^a ۱/۴۷	۵/۰۳±۵۸/۴۳	۸۹/۵۰± ^a ۱/۱۵	۱۰۶/۵±۴/۶	۸/۲۶± ^a ۰/۴۴	^a ۶/۷±۱۶۱/۵	۱۹۱/۸±۴/۵	۲۹۵/۱± ^a ۱۴/۲	۲۲۵± ^a ۳/۸	کنترل دیابتی
۳۸/۶۷± ^b ۰/۸۱	۴۱/۳۶± ^b ۴/۳	۷۵/۶۷± ^b ۳/۵۵	۹۵/۱۷± ^b ۴/۱۶	۶/۶۶± ^b ۰/۳۵	^b ۲/۶±۲۰۰/۵	۱۹۰/۶±۳/۱	۱۳۹/۸± ^{a,b} ۹/۳±	۲۱۵± ^a ۱۲/۶	دیابتی + ۱۰ mg/kg bw
۳۲/۸۳±۱/۹۴	۵۹/۷۰±۷/۱	۹۳/۱۷±۴/۱۶	۱۱۱/۱۷±۵/۸	۷/۱۱± ^b ۰/۳۱	^b ۶/۳±۱۹۵	۱۸۸/۶±۵/۱	۲۰۶± ^{a,b} ۱۱	۲۲۱± ^a ۱۱/۵	دیابتی + ۱۵ mg/kg bw

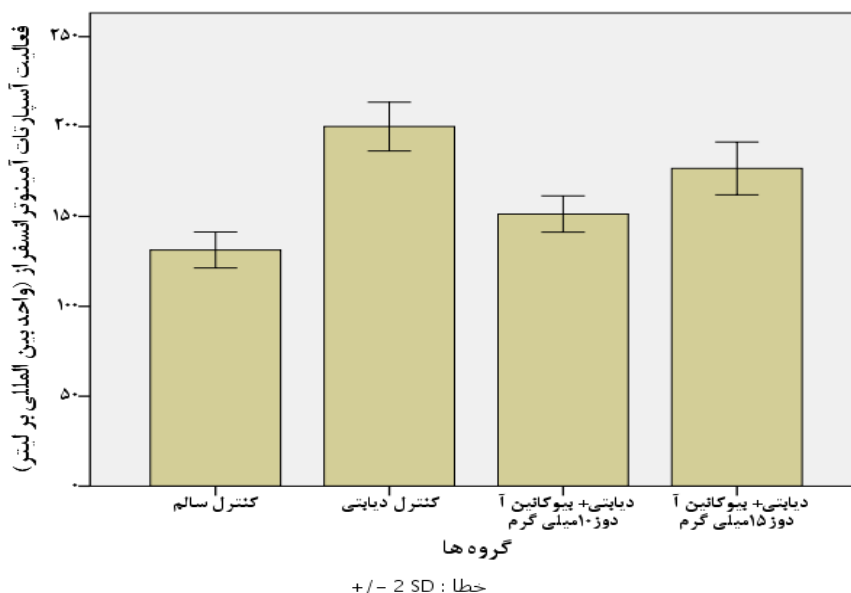
در هر گروه، ۶ حیوان استفاده‌شدند و داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار هستند.

$p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی

$p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل سالم

آنزیم‌ها، کاهش‌یافته‌است و به میزان نرمال، نزدیک شده‌است؛ تأثیر حفاظتی دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، بیشتر مشهود است.

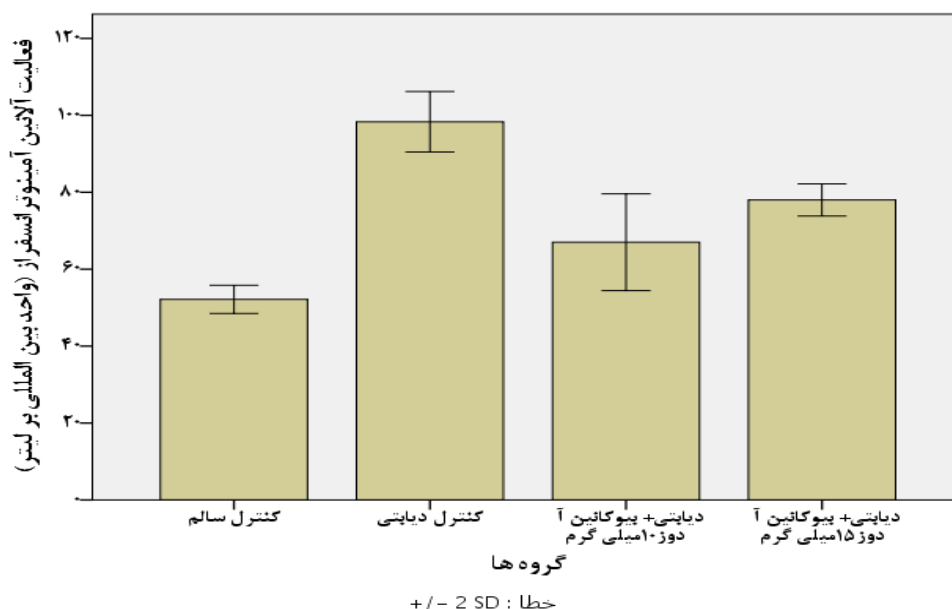
همان‌طورکه در شکل ۱ مشاهده‌می‌شود، فعالیت آنزیم کبدی AST در گروه دیابتی در مقایسه با گروه سالم، افزایشی معنی‌دار را نشان‌می‌دهد ($p < 0.05$)؛ اما در گروه سوم و چهارم که با بیوکائین آ درمان‌شده‌اند، فعالیت این



شکل ۱. مقایسه میزان آنزیم کبدی AST در سرم گروه‌های سالم، کنترل دیابتی و دیابتی درمان‌شده با بیوکائین آ فعالیت آنزیم کبدی ALT در گروه دیابتی در مقایسه با گروه سالم، افزایشی معنی‌دار را نشان‌می‌داد ($p < 0.05$)؛ میلی‌گرم بر کیلوگرم درمان‌شده‌اند، فعالیت این آنزیم

مشاهده شد گرچه تفاوت، معنی دار نبود.

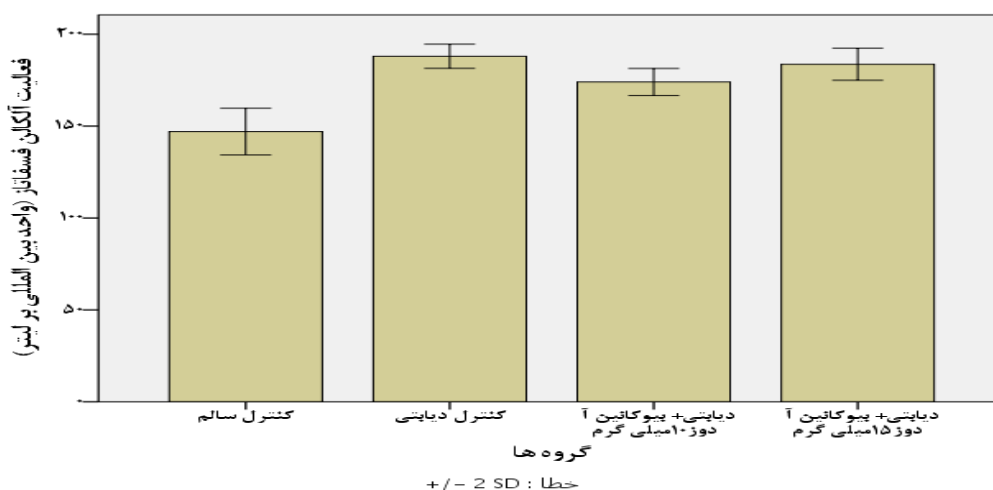
به طور معنی دار، کاهش یافته است و به میزان نرمال نزدیک شده است (شکل ۲). در استفاده از دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش در فعالیت این آنزیم



شکل ۲. مقایسه میزان آنزیم کبدی ALT در سرم گروه های سالم، کنترل دیابتی و دیابتی درمان شده با بیوکائین آ

میلی گرم بر کیلوگرم، اثر حفاظتی معنی داری را نشان می دهد؛ در صورتی که در گروه چهارم، این کاهش معنی دار نیست.

شکل ۳ نشان می دهد که فعالیت آنزیم کبدی ALP در گروه دیابتی در مقایسه با گروه سالم، افزایشی معنی دار دارد ($p < 0.05$)؛ اما درمان با بیوکائین آ با دوز ۱۰

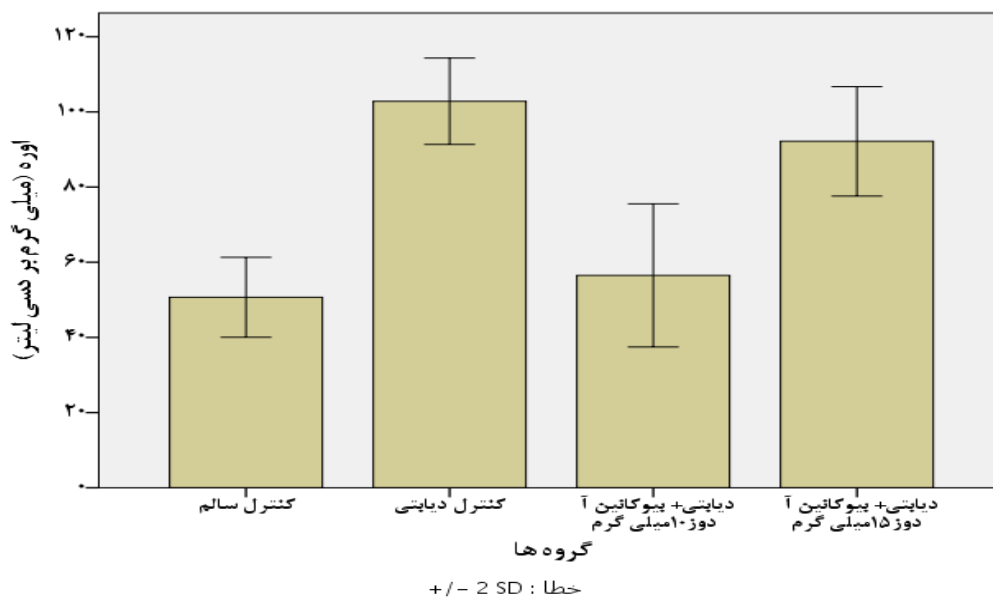


شکل ۳. مقایسه میزان آنزیم کبدی ALP در سرم گروه های سالم، کنترل دیابتی و دیابتی درمان شده با بیوکائین آ

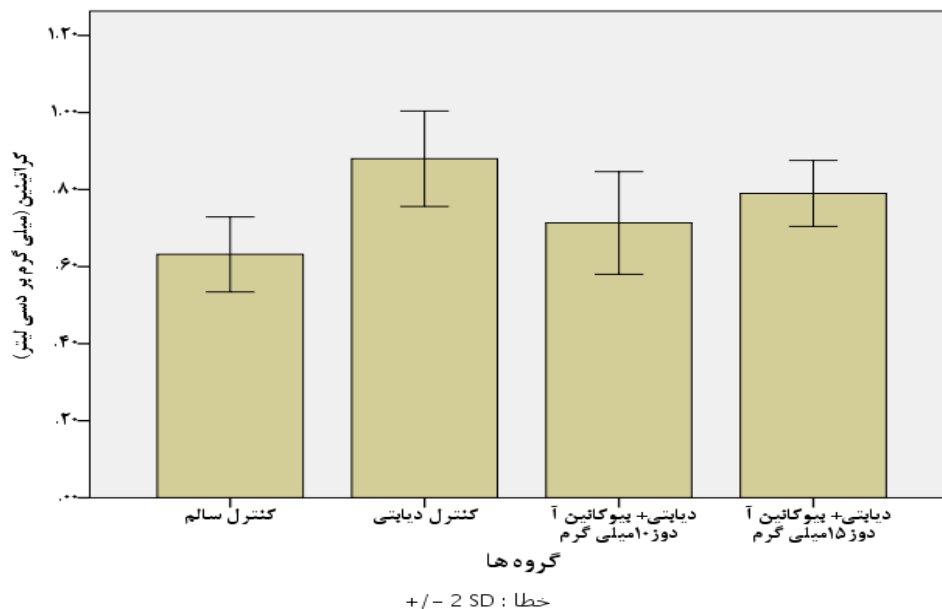
قابل ملاحظه در اویره شد ($p < 0.05$) ولی تجویز بیوکائین آ با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم، موجب کاهش معنی دار

آزمون های مربوط به عملکرد کلیه نشان می دهند که تزریق STZ و دیابتی شدن موش ها، موجب افزایشی

در اوره سرم شد که این تغییر در دوز دیگر آن، معنی‌دار نبود؛ نتایج در شکل ۴ نشان داده شده‌اند.



شکل ۴. مقایسه میزان اوره در سرم گروه‌های سالم، کنترل دیابتی و دیابتی درمان شده با بیوکائین آ در خصوص کراتینین نیز، تزریق STZ و دیابتی شدن موش‌ها، موجب افزایشی قابل ملاحظه در کراتینین سرم شد ($p < 0.05$)؛ ولی تجویز بیوکائین آ با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، موجب کاهش معنی‌دار در کراتینین سرم شد ($p < 0.05$) که باز هم این کاهش در دوز دیگر، معنی‌دار نبود؛ نتایج در شکل ۵ نشان داده شده‌اند. در کل می‌توان گفت که دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، اثر حفاظتی بهتر و سمیت کمتری را به همراه داشت.



شکل ۵. مقایسه میزان کراتینین در سرم گروه‌های سالم، کنترل دیابتی و دیابتی درمان شده با بیوکائین آ

بحث

تحقیق در خصوص داروهای جدید در زمینه دیابت آشکار می‌شود. گیاهان، منابعی قابل دسترس هستند که

با توجه به شیوع دیابت و عوارض طولانی مدت آن و محدودیت در روش‌های کنترل این بیماری، ضرورت

به موش‌های دیابتی تجویز شدند و آثار آن بر نشانگرهای سلامت کبدی و کلیوی ارزیابی شدند.

تزریق دوز بالای STZ، در موش‌های صحرایی، ترشح انسولین را به شدت سرکوب کرده، حالتی شبیه به دیابت نوع ۱ ایجاد می‌کند؛ در حالی که تجویز دوز کم STZ، با تخریب برخی از سلول‌های بتای پانکراس و سرکوب نسبی ترشح انسولین، حالتی شبیه مراحل پایانی دیابت نوع ۲ را به وجود می‌آورد (۱۴)؛ در این مورد، تفاوت میان غلظت پلاسمایی انسولین گروه‌های دیابتی و سالم، بسیار کم است ولی قند خون ناشتا در رت‌های دیابتی، بسیار افزایش می‌یابد؛ لذا حالتی شبیه به مقاومت به انسولین پدید می‌آید (۱۵)؛ مقاومت به انسولین شرایط پاتوفیزیولوژیکی است که در آن، سطح طبیعی هورمون انسولین در سرم قادر نیست قند خون را کاهش دهد (۱۶). در رت‌های دیابتی، افزایش گلوکز مشهود بود ولی درمان با بیوکائین آ، موجب کاهش سطح گلوکز شد هرچند میزان قند خون، هنوز از سطح نرمال، بالاتر بود. درمان با بیوکائین آ به شکل مؤثر، ترشح انسولین را افزایش داده، قند خون را کنترل می‌کند. رت‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با گروه کنترل سالم به کاهش شدید وزن، دچار می‌شوند (۱۷)؛ دلیل این امر، نقص در متابولیسم گلوکز و افزایش تجزیه پروتئین‌های بافتی است (۱۸) مصرف خوراکی بیوکائین آ در خلال سی روز در موش‌های دیابتی، باعث بهبود وزن رت‌ها شده، وضعیت سلامتی و بنیه و توان حیوانات بهبود یافته بود؛ علت بهبود وزن رت‌های دیابتی به احتمال به دلیل افزایش انسولین و کنترل قند است.

HbA1c نیز در رت‌های دیابتی با مصرف بیوکائین آ کاهشی قابل ملاحظه نشان داد. در رت‌های دیابتی، میزان TG سرم افزایشی چشمگیر نشان داد؛ سطح کلسترول تام و LDL-c نیز هرچند به میزانی ناچیز، افزایش داشت در صورتی که سطح HDL-c، کاهشی چشمگیر را نشان داد. غیرطبیعی بودن پروفایل لیپیدی، یکی از

به‌طور مستقیم و غیرمستقیم از آنها دارو گرفته می‌شود و در سراسر جهان از مدت‌ها پیش از آنها در تهیه دارو و درمان استفاده می‌شده است؛ به‌عنوان نمونه، کارآزمایی بالینی انجام شده روی ۶۰ بیمار نشان داده است که گیاه کندر، آثار ضد دیابتی را از طریق افزایش ترشح انسولین و کاهش سطح گلوکز خون در افراد دیابتی نوع ۲ اعمال می‌کند (۱۰)؛ همچنین مصرف خوراکی کنگر فرنگی در موش‌های صحرایی دیابتی شده دارای اثر کاهنده قند خون بوده، موجب تغییر سودمند در سطح کلسترول HDL و LDL می‌شود (۱۱)؛ استفاده از این گیاه در بروز هیپرتانسیون متعاقب، در مدل تجربی دیابت قندی نوع ۲ در موش صحرایی مؤثر بوده است (۱۲)؛ مطالعه‌ای دیگر نشان می‌دهد که مصرف سرشاخه گیاه تاج‌خروس در موش صحرایی مبتلا به دیابت قندی، دارای اثر هیپو گلیسمیک بوده، موجب تغییر سودمند در لیپیدهای سرم به جز تری‌گلیسرید و کلسترول توتال می‌شود (۱۳).

تاکنون حدود هشتصد گیاه با خواص ضد دیابتی شناسایی شده‌اند. برخی داروهای گیاهی علاوه بر فوایدی که برای انسان دارند، ممکن است دارای آثار جانبی بر سایر بافت‌ها باشند؛ این آثار، صرف‌نظر از مفید یا مضر بودن، باید به‌طور کامل شناسایی شوند. در پژوهش‌های اخیر، بیوکائین آ به دلیل اثر کاهش‌دهندگی قند و چربی‌های خون، مورد توجه قرار گرفته است؛ اما هنوز به‌طور کامل، مشخص نشده است که این ایزوفلاون با دارابودن آثار مفید در درمان دیابت، چه تأثیرهایی بر عملکرد سایر بافت‌های بدن دارد. در این مطالعه، آثار سمی این ترکیب بر دو ارگان مهم «کبد و کلیه» بررسی شده است؛ ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق STZ دیابتی شده‌اند و با اندازه‌گیری میزان گلوکز خون در حالت ناشتا و نیز HbA1c و بررسی پروفایل لیپیدی، دیابتی شدن موش‌های صحرایی به اثبات رسیده است؛ سپس، دوزهای مختلف بیوکائین آ به صورت خوراکی

عدم سمیت بیوکائین آ و بهبود ایتلیوم مجاری صفراوی و کلستاز است (۲۸).

تغییر در فعالیت آمینوترانسفرازهای کبد، موجب تشویق راه‌اندازی گلوکز از اسیدهای آمینه و تغییر در فعالیت AST و ALT پلاسما می‌شود؛ فعالیت این دو آنزیم، ممکن است با انواع مواد شیمیایی، بیولوژیکی و عوامل فیزیولوژیک یا اختلال در چرخه کربس تغییر کند و کاهش فعالیت چرخه کربس، باعث کاهش ترکیب‌های حد واسط و درنهایت، کاهش AST و ALT شود (۲۹).

به‌نظر می‌رسد که کاهش فعالیت آنزیمی در گروه‌های تحت درمان به دلیل وجود ترکیب آپی ژنین باشد که از فعالیت پیش‌سازهای ALP و آمینو ترانسفرازها جلوگیری می‌کند؛ البته این فرضیه به مطالعات بیشتر نیاز دارد.

مطالعات نشان می‌دهند که مصرف فلاونوئیدها در غلظت‌های پایین از سلول علیه مسمومیت سلولی، شکسته‌شدن DNA و آپوپتوز القا شده توسط پراکسید هیدروژن محافظت می‌کنند ولی غلظت‌های بالای آنها، خود باعث مسمومیت سلولی، آسیب به DNA و مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شود (۳۰) و تولید گونه‌های فعال اکسیژن را افزایش می‌دهند.

نتایج بررسی تغییرهای اوره و کراتینین سرم، از افزایش معنی‌دار این ترکیب‌ها در موش‌های دیابتی حکایت دارند و نشانه آسیب کلیوی است با توجه به نتایج سرمی اوره و کراتینین در موش‌های دیابتی پس از تزریق STZ و از آنجا که میزان اوره و به‌خصوص کراتینین سرم از رایج‌ترین نشانه‌های آزمایشگاهی عملکرد کلیه است و ارتباطی نزدیک با فیلتراسیون گلومرولی دارد. به‌نظر می‌رسد که STZ روی عملکرد گلومرولی، آثار توکسیک دارد. هرچند افزایش سطح کراتینین و اوره به‌عنوان نشانگر غیرمستقیم سرعت فیلتراسیون گلومرولی به‌ضرورت منعکس‌کننده آسیب کلیوی نیست بلکه ممکن است به‌طور ثانویه، بیانگر دهیدراتاسیون، هایپوولمی و کاتابولیسم پروتئین باشد

شایع‌ترین ناهنجاری‌های دیابت است (۱۹) و عاملی خطرناک برای بیماری عروق کرونر به‌شمار می‌رود (۲۰). درمان با بیوکائین آ موجب کاهش در TG، کلسترول توتال، LDL-c و افزایش HDL-c شده، کاهش TG، ممکن است به دلیل آثار کلی آنتی‌هیپرگلیسمیک باشد که به سبب هم‌پوشان بودن چرخه متابولیسم گلوکز اسیدچرب است (۲۱ و ۲۲)؛ لذا مصرف بیوکائین آ می‌تواند موجب افزایش مصرف گلوکز و بهبود وضعیت هیپرگلیسمیک شود.

نتایج بالا از آثار آنتی‌دیابتیک و کاهنده لیپید سرم، متعاقب مصرف بیوکائین آ حکایت دارند. در ادامه، مطالعه آثار سمیت این ترکیب گیاهی بر نشانگرهای کبدی و کلیوی بررسی شد. آنزیم‌های کبدی، مانند ALT، AST و ALP آنزیم‌هایی هستند که به‌طور ویژه منعکس‌کننده نکروز هپاتوسیت‌های کبدی و کلستاز هستند و در تشخیص بیماری‌های کبدی نظیر التهاب کبد کاربرد دارند (۲۳ و ۲۴). در سگ، گربه، خرگوش و موش صحرایی، آنزیم ALT ویژه سیتوزول‌های هپاتوسیت‌های کبدی است که به‌دنبال تغییر در فعالیت کبدی در پلاسما خون افزایش می‌یابد (۲۵)؛ AST نیز برای تشخیص نارسایی‌های کبدی پیشنهاد شده است (۲۶). ALP یک گلیکوپروتئین متصل به غشاست که در بافت‌های مختلف، مانند کبد، استخوان و به مقدار کمتر در کلیه و روده و جفت یافت می‌شود و یک شاخص بیوشیمیایی با ارزش در تشخیص پوکی استخوان و اختلال‌های کبدی صفراوی و بیماری کبد چرب است (۲۶ و ۲۷).

مطالعه ما نشان داد که آنزیم‌های کبدی در رت‌های دیابتی، نسبت به گروه کنترل سالم، افزایشی معنی‌دار داشته‌است. از آنجا که افزایش آنزیم‌های AST و به‌ویژه ALT، بیانگر آسیب کبد و خروج آنزیم‌ها از سیتوزول سلول به درون خون است، تجویز بیوکائین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، سبب کاهش این آنزیم‌ها به‌طور معنی‌دار و برگشتن به سطح نرمال شد و این امر، نشانه

به بافت چشم به‌طور کامل، مشهود بود؛ ولی در گروه‌های سوم و چهارم که تحت درمان با بیوکائین آ قرارداشتند، آسیب وارد شده به بافت چشم به‌طور کامل، مرتفع شده بود؛ البته این یافته به بررسی و مطالعه بیشتر نیاز دارد.

در مطالعات بعدی، لازم است، پژوهشگران درخصوص آثار این ایزوفلاونوئید ارزشمند بر سایر ارگان‌ها مطالعه‌کنند و با طراحی مطالعات بالینی روی داوطلبان انسانی، یافته‌هایی ارزشمندتر به‌دست‌آورند.

منابع

1. Koyuturk M, Ozsoy-Sacan O, Bolkent S, Yanardag R. Effect of Glurenorm on immunohistochemical changes in pancreatic β -cells of rats in experimental diabetes. *Indian journal of experimental biology* 2005;43(3):268-71.
2. Engalgau M, Geiss L, Saaddine J, Boyle J, Benjamin S, Gregg E, et al. The evolving diabetes burden in the United States. *Annals of internal medicine* 2004;140(11):945-50.
3. Tahrani A, Piya M, Kennedy A, Barnett A. Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacology & Therapeutics* 2010;125(2):328-61.
4. Zhang L, Yang J, Chen X, Zan K, Wen X, Chen H, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology* 2010;132(2):518-24.
5. Grover J, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacol* 2002;81(1):81-100.
6. Brahmachari G. Bio-flavonoids with promising antidiabetic potentials: A critical survey. *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry* 2011:187-212.
7. Cassidy J, Zennie T, Chae Y, Ferin M, Portuondo N, Baird W. Use of a mammalian cell culture benzene(a)pyro metabolism assay for the detection of potential anticarcinogens from natural products. *Cancer research* 1988;48:6257-61.
8. Gotoh T, Yamada K, Yin H, Ito A, Kataoka T, Dohi K. Chemoprevention of N-nitroso-N-methylurea-induced rat mammary carcinogenesis by soy foods or biochanin A. *Japanese journal of cancer research* 1998;89(2):137-42.
9. Azuma Y, Onishi Y, Sato Y, Kizaki H. Effects of protein tyrosine kinase inhibitors with different modes of action on topoisomerase activity and death of IL-2 dependent CTLL-2 cells. *The Journal of Biochemistry* 1995;118(2):312-8.
10. Ahangarpour A, Akbari Fatemeh Ramezani A, Heidari H, Pakmehr M, Shahbazian H, Ahmadi I, et al. The effect of *Boswellia serrata* on blood glucose, insulin level and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Daneshvar* 2013;20(103):11-8.
11. narenjkar j, roghani m, sedaghat r, tahami m. Evaluation of the effect of *Cynara scolymus* L. Feeding on Serum Glucose and Lipids in Female Diabetic Rats. 2. [Research] 2009;17(83):13-20.

(۳۱)؛ درمان با بیوکائین آ به‌طور معنی‌داری از میزان اوره و کراتینین سرم می‌کاهد؛ لذا می‌توان گفت که گروه‌های یادشده نسبت به رت‌های دیابتی، عملکرد کلیوی بهتری دارند و می‌توان نتیجه‌گرفت که بیوکائین آ نه‌تنها روی کلیه موش‌های صحرائی، اثر توکسیک نداشته، بلکه در بهبودی آثار نامطلوب STZ بر بافت کلیه، تأثیری بسزا دارد.

نتیجه قابل‌توجه دیگر مطالعه حاضر، این بود که بیوکائین آ بر بافت چشم موش‌های صحرائی، اثر حفاظتی داشت و از تخریب بافت چشم جلوگیری کرد؛ به‌طوری‌که در گروه کنترل دیابتی، آسیب ناشی از STZ

12. Narenjkar J, Rroghani M, Sedaghat R, Tahami M. The effect of oral feeding of *Cynara scolymus* L. on thoracic aorta contractile response in diabetic rats. 2. [Research] 2010;17(87):43-52.
13. Roghani M, Qeini M, Mousavi S, Ansari F, Sharayeli M. Evaluation of the Effect of Oral *Amaranthus caudatus* Administration on Reduction of Blood Glucose and Lipids in Female Rat 2. [Research]. 2010;17(85):19-28.
14. Reed M, Meszaros K, Entes L, Clayopool M, Pinkett J, Gadbois T, et al. A new rat model of type 2 diabetes, the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000;49:1390-4.
15. Rahele D, Jenkins A, Bozиков V, Pavic E, Fairgrieve C, Romic D, et al. Glycemic index in diabetes. *Collegium antropologicum*. 2011;35:1363-8.
16. Kim E-M, Grace Mk, Welch Cc, Billington Cj, Levine As. STZ-induced diabetes decreases and insulin normalizes POMC mRNA in arcuate nucleus and pituitary in rats. *American Journal of Physiology* 1999;276(5 pt 2):R1 320-6.
17. Chen V, Ianuzzo C. Dosage effect of streptozotocin on rat tissue enzyme activities and glycogen concentration. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1982;60(10):1251-6.
18. Sezik E, Asla M, Yesilda E, Ito S. Hypoglycaemic activity of *Gentiana olivieri* and isolation of the active constituent through bioassay-directed fractionation techniques. *Life sciences* 2005;76(11):1223-38.
19. Murali B, Upadhyaya U, Goyal R. Effect of chronic treatment with *Enicostemma littorale* in non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) rats. *Journal of ethnopharmacology* 2002;81(2):199-204.
20. Maghrani M, Lemhadri A, Zaggwagh N, Amraoui M, Haloui M, HJouad, et al. Effects of an aqueous extract of *Triticum repens* on lipid metabolism in normal and recent-onset diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology* 2004;90(2-3):331-7.
21. Randle P, Garland P, Hales C, Newsholme E. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963;1(7285):785-9.
22. Eidi A, Eidi M. Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2009;3(1):40-4.

23. Kim W, Flamm S, Bisceglie AD, Bodenheimer H. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology* 2008;47(4):1363-70.
24. Romeo S, Sentinelli F, Dash S, Yeo G, Savage D, Leonetti F, et al. Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *International journal of obesity* 2010;34(1):190-4.
25. Kramer JW, Hoffman WE. Clinical enzymology. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic Press. San Diego: Toronto; 1997. 303-25.
26. Ali A, Penny C, Paiker J, Niekerk CV, Smit A, Ferris W, et al. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3-L1. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2005;354(1-2):101-9.
27. Webber M, Krishnan A, Thomas N, Cheung B. Association between serum alkaline phosphatase and C-reactive protein in the United States national health and nutrition examination survey 2005–2006. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2010;48(2):167-73.
28. Ates J.A: Principles of drug therapy. In: Fauci A.S, Braunwald E, Isselbacher KJ. et al (eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th ed., Mc Graw Hill 1998; 1663-1667.
29. MAA Metwally. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in *Tilapia Nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2009;1(1):56-64.
30. Watjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkotter A, et al. Low concentrations of flavonoids is protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of Nutrition* 2005;135(3):525-31.
31. Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Molecular and cellular biology* 1994;14(2):1431-7.

Protective effect of biochanin A on the hepatic and renal function of diabetic rats

Reza Azizi¹, Mohamadtaghi Goodarzi², Zahra Salemi^{3*}

1. Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
2. Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
3. Department of Biochemistry, Arak University of Medical Sciences , Arak, Iran.

E-mail: dr.zsalemi@arakmu.ac.ir

Abstract

Background and Objective: Biochanin A, a bioflavonoid in red clover and soybeans, is well-known as an anti-diabetic and anti-lipidemic flavonoid. The aim of this investigation was to study the renal and hepatic effects of biochanin A in streptozocin-induced diabetic rats.

Materials and Methods: Diabetes was induced in Wistar rats by administration of streptozocin (35 mg/kg of body weight) intraperitoneally. Diabetic rats were treated with 10 and 15 mg/kg (body weight) of biochanin A in 5% DMSO for 30 days. Body weight and biochemical parameters including fasting blood glucose level (FBG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), lipid profile, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), urea and creatinine were assessed.

Results: The data showed normalization and restoration of biochemical parameters such as body weight (BW), FBG, HbA1c and lipid profile in STZ-diabetic rats after oral administration of biochanin A. The results showed significant increases in hepatic enzymes, urea and creatinine in STZ-diabetic rats and oral administration of biochanin A significantly decreased AST, ALT, ALP, urea and creatinine. The data of this investigation also indicate that protective effect of biochanin A on hepatic and renal tissues is greater at a dose of 10 mg/kg as compared to a dose of 15 mg/kg.

Conclusion: Oral administration of biochanin A due to its anti-diabetic, anti-lipidemic effect has a protective effect on hepatic and renal function. The data of this investigation indicate that biochanin A is not toxic.

Key words: Biochanin A, Kidney, Liver, Rat