

اثر هسپرتین بر سطح سرمی آنزیم‌های آسپاراتات و آلانین آمینو ترانسفراز و سطح کبدی و قلبی مالون دی آلدئید در موش صحرائی دیابتی

نویسندگان: دکتر جمشید نارنجکار^۱، دکتر مهرداد روغنی^{۲*} و مهدی شکوهی^۳

۱- دانشیار- گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۲- استاد- گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، تهران، ایران

۳- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: mehjour@yahoo.com

* نویسنده مسئول: دکتر مهرداد روغنی

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت قندی با افزایش میزان مالون دی آلدئید به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو و افزایش سطح سرمی آنزیم‌های بافتی نظیر آسپاراتات و آلانین آمینوترانسفراز ناشی از آسیب بافتی مشخص می‌شود. با توجه به اثر ضددیابتی هسپرتین، هدف از انجام این مطالعه ارزیابی اثر این ماده بر سطح این فاکتورها در حالت دیابت است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرائی نر در گروه‌های ۳۲ تایی کنترل، کنترل تحت تیمار، دیابتی و دیابتی تحت تیمار تقسیم شدند. برای القاء دیابت، استرپتوزوسین با دوز 60 mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد. هسپرتین با دوز 10 mg/kg برای مدت چهار هفته به‌طور روزانه یک هفته پس از شروع کار تجویز شد. سطح سرمی آسپاراتات و آلانین آمینوترانسفراز قبل و در انتهای کار اندازه‌گیری شد؛ به‌علاوه سطح مالون دی آلدئید در دو بافت قلب و کبد اندازه‌گیری شد.

نتایج: افزایشی معنادار در سطح سرمی آسپاراتات و آلانین آمینوترانسفراز در موش‌های دیابتی مشاهده شد ($p < 0.05-0.01$) و درمان با هسپرتین تنها سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز را در حد معنادار کم کرد ($p < 0.05$)؛ به‌علاوه، حالت دیابت، افزایش سطح مالون دی آلدئید در دو بافت قلب و کبد را سبب شد ($p < 0.01$) و درمان با هسپرتین سطح مالون دی آلدئید را در این دو بافت در حدی معنی‌دار کاهش داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: درمان با هسپرتین می‌تواند سطح سرمی آلانین آمینو ترانسفراز و همچنین استرس اکسیداتیو را کاهش دهد که با سطح بافتی کمتر مالون دی آلدئید در دو بافت قلب و کبد مشخص می‌شود.

واژگان کلیدی: هسپرتین، دیابت قندی، آمینوترانسفراز، مالون دی آلدئید

دوماهنامه علمی-پژوهشی

دانشگاه شاهد

سال هیجدهم - شماره ۸۹

آبان ۱۳۸۹

وصول: ۸۹/۶/۱۶

آخرین اصلاحات: ۸۹/۹/۲۵

پذیرش: ۸۹/۹/۲۹

مقدمه

دیابت قندی از نظر بالینی یکی از مهم‌ترین عوامل خطر برای اختلال‌های دیگر نظیر نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی-عروقی محسوب می‌شود که بر اساس پیش‌بینی به‌عمل‌آمده، شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش خواهد یافت (۱)؛ به‌علاوه، مشکلات قلبی، عروقی و کبدی ناشی از بیماری‌ها به-ویژه بیماری‌های متابولیک مانند دیابت قندی درصد بالایی از افراد جامعه را در سنین بالا گرفتار می‌کند (۲). از نظر بالینی، حتی در زمان تشخیص، بیماری دیابت به میزان زیادی پیشرفت کرده‌است که این اهمیت کنترل رژیم غذایی و لزوم استفاده از درمان‌ها و اقدام‌های پیشگیری‌کننده را به خوبی مشخص می‌سازد (۳-۲). دیابت قندی همچنین ارتباط گسترده و نزدیکی با استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که افزایش قند خون با افزایش استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف همراه است و خود این بسیاری از عوارض بیماری را به‌دنبال دارد (۶-۴). از نظر بیوشیمیایی، از جمله شاخص‌های بافتی این پدیده‌های مخرب، افزایش سطح دو آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در پی آسیب بافت‌های نظیر قلب و کبد در سرم و افزایش سطح مارکر مالون دی‌آلدئید در جایگاه یکی از شاخص‌های معتبر استرس اکسیداتیو است (۷-۶)؛ از طرف دیگر، کاهش دادن این تغییرها با استفاده از مواد مؤثر گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانت اهمیت زیادی دارد (۳)؛ در این خصوص، هسپرتین در گروهی از فلاونوئیدها به نام فلاوانون‌ها به فراوانی در پوست میوه مرکباتی مثل پرتقال و گریپ فروت یافت می‌شود و آثار فیزیولوژیک و سودمند متعددی از جمله «کاهش دادن آسیب‌پذیری دیواره مویرگی و ضد تومور را (۸)؛ آثار آنتی‌اکسیدانتیو کاهش دادن استرس اکسیداتیو و آسیب بافتی (۹)، کاهش دادن فشار خون شریانی، پایین آوردن کلسترول خون و بهبود دادن متابولیسم چربی‌ها» را در پی دارد (۱۴-۱۰)؛ به‌علاوه، این

ماده، خاصیت محافظت‌کنندگی سیستم عصبی (۱۵) و ضد تجمع پلاکتی (۱۶) را داراست؛ در این بررسی، اثر تجویز هسپرتین بر سطح سرمی آنزیم‌های آسپاراتات و آلانین آمینو ترانسفراز و میزان مالون دی‌آلدئید کبد و قلب در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین بررسی شد.

مواد و روش کار

حیوانات

در این مطالعه تحقیقاتی تجربی از ۳۲ سر موش صحرایی نر سفید، نژاد ویستار (انستیتو پاستور، کرج) در محدوده وزنی ۲۸۰ تا ۲۳۰ گرم استفاده شد. تمام حیوانات در دمای ۲۱ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های سه یا چهارتایی در هر قفس قرار داده شدند. موش‌ها آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) برای مدت شش هفته دسترسی داشتند.

روش انجام کار

در این بررسی از آن دسته موش‌های صحرایی نر استفاده شد که در شرایط طبیعی، بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم آنها کمتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود؛ در این خصوص از شبکه رترواوربیتال و لوله موئینه برای خون‌گیری استفاده شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با هسپرتین، دیابتی و دیابتی تحت تیمار با هسپرتین تقسیم شدند. تیمار با هسپرتین به فرم داخل صفاقی به میزان ده میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته به‌طور روزانه یک هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین و اطمینان از دیابتی بودن حیوانات انجام شد. داروی هسپرتین در حلال کروموفور (سیگما) حل و با نرمال سالین رقیق شده، به حجم مورد نظر برای تزریق رسید؛ حجم تزریق در مورد هر حیوان نیز در حد ۰/۳ میلی‌لیتر بود. برای دیابتی کردن موش‌ها، از داروی استرپتوزوتوسین (فارماشیا-آپجون) به صورت تک‌دوز و داخل صفاقی به میزان شصت

آمینوترانسفراز (AST) از کیت‌های بیوشیمیایی مربوط و با توجه به دستورالعمل کیت (زیست شیمی) استفاده گردید؛ در این خصوص، مقادیر جذب بلانک سرم، جذب نمونه تست، جذب استاندارد و جذب بلانک معرف به دست آمد که در نهایت، طبق فرمول زیر، نسبت درصد پیروات حاصل شد و با قراردادن عدد به دست آمده روی محور عمودی منحنی استاندارد کیت، میزان فعالیت آنزیم در محور افقی خوانده شد.

میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد. میزان گلوکز سرم با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (زیست شیمی) قبل از انجام کار و در هفته‌های دو و چهار با استفاده از اسپکتروفتومتر (اسپکترونیک ۲۰، آمریکا) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی (آنزیمی)

سرم

برای به دست آوردن مقادیر سرمی آنزیم‌های کبدی و قلبی شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات

$$\text{نسبت درصد پیروات} = \frac{\text{جذب بلانک سرم} - \text{جذب تست}}{\text{جذب بلانک معرف} - \text{جذب استاندارد}} \times 100$$

درجه سانتی‌گراد به مدت پانزده دقیقه انجام و بعد از سرد کردن نمونه، جذب نوری خوانده شد. برای این کار، از نمونه‌های سانتریفوژ شده به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر برداشته شده، به ۱/۵ cc تری کلرو استیک اسید و ۱/۵ cc از TBARS اضافه شد و تمامی نمونه‌ها و لوله‌های استاندارد با رقت‌های مختلف به مدت هشتاد دقیقه در بن‌ماری آب‌جوش قرار داده شد که واکنش صورت بگیرد؛ سپس محلول‌ها در دور سه هزار دور به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شده، جذب نوری آنها در طول موج ۵۳۲ nm در دستگاه اسپکتروفتومتر (اسپکترونیک ۲۰، آمریکا) خوانده شد؛ منحنی استاندارد نیز بر اساس رقت‌های تترا اتوکسی پروپان تهیه شد و جذب‌های نوری به دست آمده از نمونه‌ها در منحنی استاندارد تطبیق داده شده، غلظت مالون دی آلدئیدیه این ترتیب به دست آمد و نتایج بر حسب میکروگرم در میکرولیتر حاصل شد.

سنجش پروتئین

سنجش پروتئین به روش برادفورد انجام گرفت؛ در این روش، ابتدا معرف مربوط تهیه شد؛ این معرف به این صورت تهیه گردید که ۲۵ میلی‌گرم کوماسی بلو در

سنجش مالون دی آلدئید بافتی

پس از پایان کار و کشتن حیوان به روش یوتنزی، قلب و کبد از بدن جدا شده، پس از شست‌وشو با محلول سالین سرد و خشک کردن سریع، توزین شدند و سپس بافت‌ها جداگانه همراه بافر تریس به مدت دو دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور پانصد دور در دقیقه هموژنیزه گردیدند و محلول هموژنیزه شده، سانتریفوژ شد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تمامی مراحل گفته شده در دمای چهار درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد. پس از انجام سانتریفوژ، 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 دی آلدئید MDA طبق روشی است که اساس آن واکنش تیوباربیستوریک اسید TBA است که در دمای جوش انجام می‌گیرد؛ در این آزمایش، مالون دی آلدئید یا مواد شبه مالون دی آلدئید با تیوباربیستوریک اسید واکنش داده رنگ صورتی ایجاد می‌کند که بیشترین جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر است؛ این واکنش در PH= 2-3 و در دمای نود

نتایج حاصل نشان داد که میزان وزن در هفته قبل از بررسی تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان نمی‌دهد، در حالی که طی هفته‌های دوم و چهارم، تفاوتی معنی‌دار بین گروه‌ها مشاهده گردید؛ در این خصوص در هفته چهارم، گروه دیابتی کاهشی بارز و معنی‌دار ($p < 0.05$) را در حد $21/3\%$ در مقایسه با گروه کنترل نشان داد؛ همچنین، هرچند در هفته دوم نیز این کاهش وجود داشت ولی تفاوت موجود به سطح معنی‌دار نرسید؛ از طرف دیگر، تفاوت موجود بین دو گروه دیابتی و دیابتی تحت درمان با هسپرتین در هفته‌های دوم و چهارم در حد معنی‌دار نبود، هرچند که میزان وزن در گروه دیابتی تحت تیمار به ترتیب به میزان $6/3\%$ و $11/7\%$ بیشتر از گروه دیابتی تیمارنشده در همان هفته‌ها بود؛ از سوی دیگر، تیمار گروه کنترل با هسپرتین در همین هفته‌ها تغییری معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل تیمارنشده ایجاد نکرد، اگرچه میزان وزن در حد مختصر از گروه کنترل بیشتر بود (نمودار ۱).

با اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم در هفته‌های قبل از بررسی و هفته‌های دوم و چهارم پس از بررسی در تمام گروه‌ها مشخص شد که در هفته قبل از بررسی تفاوتی معنی‌دار بین گروه‌ها یافت نمی‌شود؛ به علاوه، در هفته چهارم، میزان گلوکز سرم در دو گروه دیابتی و دیابتی تحت تیمار با هسپرتین به‌طور بسیار بارز و معنی‌دار ($p < 0.001$ و $p < 0.01$) بیشتر از نتایج هفته قبل از کار بوده است، در حالی که گروه کنترل تحت تیمار تفاوت معنی‌دار را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد؛ همچنین تیمار با هسپرتین در گروه دیابتی در همین دوره زمانی کاهشی معنی‌دار را در میزان گلوکز سرم موش‌های صحرایی در مقایسه با گروه دیابتی تیمارنشده به-وجود آورد ($p < 0.05$) (نمودار ۲).

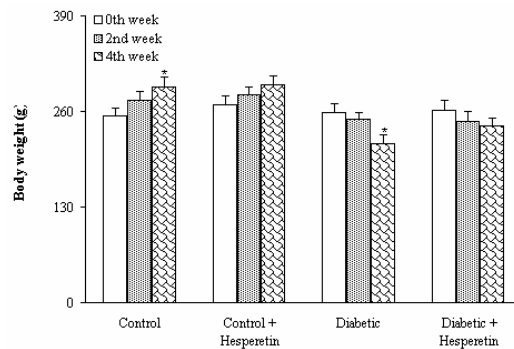
$12/5$ میلی لیتر اتانول 95 درصد حل شد، سپس 25 میلی‌لیتر اسید فسفوریک 85% اضافه شد و حجم آن به یک لیتر رسید و با کاغذ صافی، تصفیه گردید؛ همچنین غلظت‌های استاندارد تهیه شد که برای تهیه محلول استاندارد، آلبومین سرم گاوی به‌کار رفت. برای سنجش غلظت پروتئین در نمونه‌های بافتی از هر نمونه، $100 \mu\text{l}$ برداشته شده، به پنج میلی‌لیتر از معرف تهیه‌شده به آن اضافه شد؛ همچنین از غلظت‌های استاندارد تهیه شده (با غلظت $12/5$ ، 25 ، 50 ، 100) نیز $100 \mu\text{l}$ برداشته به پنج میلی‌لیتر از معرف اضافه شد. تمامی محلول‌ها، پنج دقیقه در دمای 37 درجه انکوبه شدند و سپس جذب نوری آنها در طول موج 595 nm با استفاده از اسپکتروفوتومتر (اسپکترونیک 20 ، آمریکا) خوانده شد. در نهایت، غلظت پروتئین در نمونه‌ها با استفاده از انطباق مقادیر جذب‌های نوری به‌دست‌آمده از نمونه‌ها روی منحنی استاندارد تعیین شد و نتایج بر حسب میکروگرم در میکرولیتر به‌دست‌آمد.

آنالیز آماری

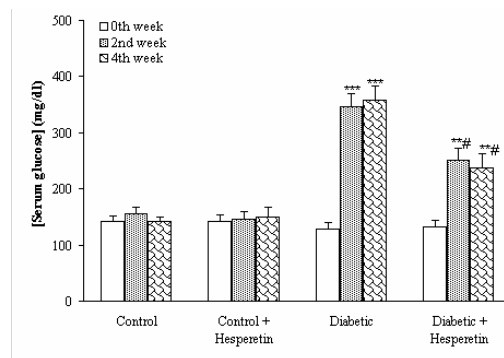
از نظر آماری، تمامی نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد. پس از مشخص کردن توزیع داده‌ها، برای مقایسه نتایج هر پارامتر در هر یک از گروه‌ها قبل و بعد از بررسی آزمون آنووا با اندازه‌گیری مکرر و برای مقایسه گروه‌ها با هم در هر یک از دوره‌های زمانی، آزمون آنووا یک‌طرفه و پست تست توکی به‌کار گرفته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

نتایج

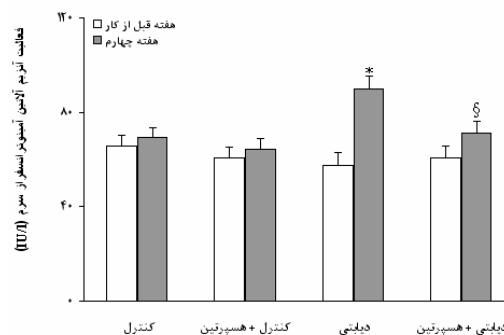
وزن حیوانات در هفته قبل از بررسی و هفته‌های دوم و چهارم پس از بررسی در تمام گروه‌ها اندازه‌گیری شد.



نمودار ۱. تغییرهای وزن، طی هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با هسپرتین ($p < 0.05$ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)



نمودار ۲. تغییرهای گلوکز سرم، طی هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با هسپرتین ($p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.05$ # (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان هفته)



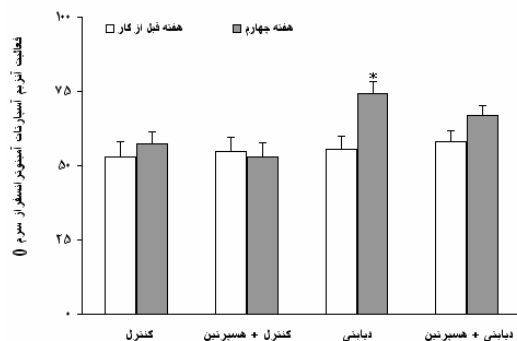
نمودار ۳: فعالیت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز سرم در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با هسپرتین ($p < 0.01$ * (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، $p < 0.05$ \$ (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده در همان هفته)

هفته‌های قبل از کار و هفته چهارم پس از کار مشخص شد (نمودار ۳ و جدول ۱) که در هفته قبل از کار از نظر آماری تفاوت معناداری بین گروه‌ها یافت نمی‌شود

سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT) با اندازه‌گیری سطح سرمی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در گروه‌های مختلف تحت بررسی در

نشان داد که همین وضعیت در مورد تفاوت بین دو گروه دیابتی و کنترل در هفته چهارم نیز وجود داشت ($P < 0.01$). در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپرتین نیز میزان افزایش سطح این آنزیم در هفته چهارم در مقایسه با گروه دیابتی کمتر بود، به طوری که سطح آنزیم در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپرتین در حد 20.8% کمتر از گروه دیابتی تیمار نشده بود که این تفاوت از نظر آماری معنادار بود ($P < 0.05$).

هرچند که سطح این آنزیم در دو گروه دیابتی و کنترل تحت تیمار با هسپرتین در حد مختصر پایین‌تر از گروه کنترل بود، با بررسی سطح آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در هفته چهارم مشخص شد که افزایشی کم و بی‌معنا در گروه‌های کنترل و کنترل تحت تیمار با هسپرتین وجود دارد. در گروه‌های دیابتی نیز سطح این آنزیم در هفته چهارم یک افزایش به نسبت قابل ملاحظه و معنادار ($P < 0.01$) را در مقایسه با هفته قبل از کار در همین گروه



نمودار ۴. فعالیت آنزیم آسپاراتات آمینو ترانسفراز سرم در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با هسپرتین ($p < 0.05$ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)

کار در همین گروه نشان داد که همین وضعیت در مورد تفاوت بین دو گروه دیابتی و کنترل در هفته چهارم نیز وجود داشت ($P < 0.05$). در گروه کنترل تحت تیمار با هسپرتین نیز کاهش سطح این آنزیم در هفته چهارم در مقایسه با همین گروه در هفته قبل از کار وجود داشت، که این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود.

سطح آنزیم مالون دی آلدئید (MDA) در بافت کبد

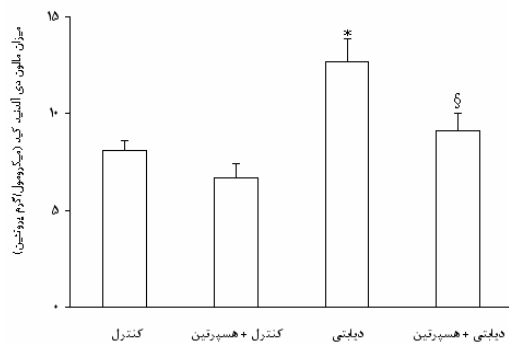
با اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید که شاخصی از استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید در بافت است، در گروه‌های مختلف تحت بررسی در هفته چهارم مشخص شد که این پارامتر در گروه کنترل تحت تیمار با هسپرتین یک کاهش مختصر و غیر معنادار در حد 17.2% نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. در گروه دیابتی تیمار نشده در هفته چهارم، سطح مالون دی

سطح سرمی آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) با اندازه‌گیری سطح سرمی آنزیم آسپاراتات آمینو ترانسفراز در گروه‌های مختلف تحت بررسی در هفته‌های قبل از کار و هفته چهارم پس از کار مشخص شد (نمودار ۴ و جدول ۱) که در هفته قبل از کار از نظر آماری تفاوتی معنادار بین گروه‌ها یافت نمی‌شود. هرچند که سطح این آنزیم در دو گروه کنترل و کنترل تحت تیمار با هسپرتین در حد مختصر پایین‌تر از گروه‌های دیگر بود. با بررسی سطح آنزیم آسپاراتات آمینو ترانسفراز در هفته چهارم مشخص شد که افزایشی کم و غیر معنادار در گروه‌های کنترل و دیابتی تحت تیمار با هسپرتین وجود دارد. در گروه‌های دیابتی نیز، سطح این آنزیم در هفته چهارم، افزایشی به نسبت قابل ملاحظه و معنادار ($P < 0.05$) در مقایسه با هفته قبل از

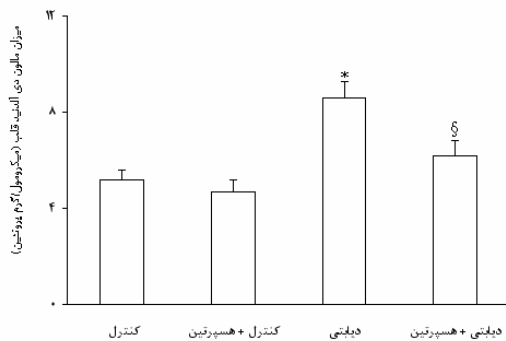
با هسپریتین، کاهش مختصر و غیر معنادار در حد 8.6٪ نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. در گروه دیابتی تیمارنشده در هفته چهارم، سطح مالون دی آلدئید، افزایش قابل ملاحظه و معنی‌دار در حد 39.4٪ نسبت به گروه کنترل نشان‌داد ($P < 0.01$) که همین وضعیت در مورد تفاوت بین دو گروه دیابتی و کنترل در هفته چهارم نیز وجود داشت ($P < 0.01$). در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپریتین نیز میزان افزایش مالون دی آلدئید نسبت به گروه کنترل در حد 16.1٪ بود؛ به‌علاوه در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپریتین سطح مالون دی آلدئید در هفته چهارم به‌طور معنادار و در حد 27.8٪ کمتر از گروه دیابتی تیمارنشده بود (نمودار ۶ و جدول ۱) ($P < 0.05$).

آلدئید، افزایشی قابل ملاحظه و معنی‌دار در حد 36.1٪ نسبت به گروه کنترل نشان‌داد ($P < 0.01$) که همین وضعیت درباره تفاوت بین دو گروه دیابتی و کنترل در هفته چهارم نیز وجود داشت ($P < 0.01$). در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپریتین میزان افزایش مالون دی آلدئید نسبت به گروه کنترل در حد 10.9٪ بود؛ به‌علاوه در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپریتین سطح مالون دی آلدئید در هفته چهارم به‌طور معنادار و در حد 28.2٪ کمتر از گروه دیابتی تیمارنشده بود (نمودار ۵ و جدول ۱) ($P < 0.05$).

سطح آنزیم مالون دی آلدئید (MDA) در بافت قلب
با اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید در بافت قلب در گروه‌های مختلف تحت بررسی طی هفته چهارم مشخص شد که این پارامتر در گروه کنترل تحت تیمار



نمودار ۵. میزان مالون دی آلدئید بافت کبد در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با هسپریتین ($p < 0.01$ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، $p < 0.05$ (در مقایسه با گروه دیابتی تیمارنشده در همان هفته)



نمودار ۶. میزان مالون دی آلدئید بافت قلب در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با هسپریتین ($p < 0.01$ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، $p < 0.05$ (در مقایسه با گروه دیابتی تیمارنشده در همان هفته)

جدول ۱. فعالیت آنزیم‌های آلانین و آسپاراتات آمینوترانسفراز در سرم و میزان مالون دی آلدئید دو بافت قلب و کبد در گروه‌های مختلف در پایان کار

میزان مالون دی آلدئید در بافت کبد (میکرومول/گرم)	میزان مالون دی آلدئید در بافت قلب (میکرومول/گرم)	فعالیت آسپاراتات آمینوترانسفراز (IU/l)	فعالیت آلانین آمینوترانسفراز (IU/l)	
۸/۱ ± ۰/۵	۵/۲ ± ۰/۴	۵۷/۴ ± ۴/۱	۶۹/۴ ± ۴/۲	کنترل
۶/۷ ± ۰/۷	۴/۷ ± ۰/۵	۵۳ ± ۴/۹	۶۴/۳ ± ۴/۷	کنترل + هسپرتین
۱۲/۷ ± ۱/۲**	۸/۶ ± ۰/۷**	۷۴/۳ ± ۴/۱*	۸۹/۹ ± ۵/۶**	دیابتی
۹/۱ ± ۰/۹§	۶/۲ ± ۰/۶§	۶۷/۲ ± ۳/۳	۷۱/۲ ± ۵/۲§	دیابتی + هسپرتین

* $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، § $p < 0.05$ (در مقایسه با گروه کنترل)، § $p < 0.05$ (در مقایسه با گروه دیابتی)

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که تجویز ساب کرونیک فلاونوئید هسپرتین به میزان ده میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت چهار هفته در موش‌های دیابتی، از کاهش وزن حیوانات به‌طور غیر معنی‌دار جلوگیری کرده، کاهش معنی‌دار میزان گلوکز سرم را موجب شد؛ سطح فعالیت آلانین آمینوترانسفراز سرم را به‌طور معنی‌دار و سطح فعالیت آسپاراتات آمینوترانسفراز سرم را به‌طور بی‌معنی در موش‌های دیابتی در مقایسه با موش‌های دیابتی تیمارنشده کاهش داد و کاهش معنی‌دار میزان مالون دی آلدئید در دو بافت کبد و قلب موش‌های دیابتی شده را سبب گردید.

کاهش کمتر وزن در گروه دیابتی تحت تیمار با هسپرتین را در این بررسی می‌توان به آثار هیپوگلیسمیک و ضد دیابتی آن نسبت داد؛ در همین ارتباط، مطالعه آکی یاما و همکاران (۲۰۰۹) روی اثر هیپوگلیسمیک مشتقات هسپرتین نشان می‌دهد که این فلاونوئید در جهت کاهش دادن مقاومت بافتی به انسولین عمل کرده، نیازمندی بافت به هورمون انسولین را از طریق تشدید فعالیت ترانسپورترهای گلوکز در دو بافت عضلانی و چربی کاهش می‌دهد (۱۷). به‌علاوه، مشتقات هسپرتین از طریق

تعدیل فعالیت آنزیم‌های کبدی مسئول متابولیسم کربوهیدرات‌ها از جمله کاهش فعالیت آنزیم فسفریلاز کبدی و افزایش فعالیت گلوکوکیناز و گلیکوژن سنتاز در جهت کاهش قند خون و برگشت وزن به حد طبیعی عمل می‌کنند (۱۷)؛ البته، با توجه به اینکه در بررسی حاضر، مدل دیابت قندی با استفاده از داروی سیتوتوکسیک استرپتوزوتوسین ایجاد گردید که تیپ ۱ بیماری با عوارض بیوشیمیایی جدی‌تر را سبب شد و سطح انسولین در آن به‌علت فقدان سلول‌های مترشحه انسولین به پایین‌ترین حد می‌رسد (۱)، لذا آثار سودمند هسپرتین بر سطح گلوکز خون را می‌توان به آثار خارج پانکراسی آن از جمله تعدیل فعالیت آنزیم‌های کبدی در مسیرهای متابولیسم کربوهیدرات‌ها و لیپیدها و بهبود مصرف این مواد در دو بافت چربی و عضلانی نسبت داد که این امر، تا حدودی با مطالعه آکی یاما و همکاران مطابقت دارد (۱۷).

از طرف دیگر، تشدید استرس اکسیداتیو، بروز عوارض بیماری‌های متابولیک نظیر دیابت قندی را موجب می‌گردد (۱۸)؛ در این رابطه، به‌دنبال بروز دیابت با گذشت زمان میزان پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد که این خود را با بالا رفتن

هسپرتین در بررسی حاضر را می‌توان به اثر هیپوگلیسمیک آن نسبت داد که این از طریق کاهش دادن سطح محصولات نهائی گلیکوزیلاسیون (AGE)، کاهش استرس اکسیداتیو و نشانه‌های آن از جمله مالون دی آلدئید در نواحی بافتی را موجب می‌گردد (۱۵).

به‌طور خلاصه، در این بررسی برای اولین بار نشان-داده شد که تجویز فلاونوئید هسپرتین به مدت یک ماه در مدل تجربی دیابت قندی در موش صحرایی، اثر آنتی هیپرگلیسمیک داشته، کاهش سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز و کاهش سطح مالون دی آلدئید در دو بافت کبد و قلب را موجب می‌گردد که این امر در کاهش عوارض ناشی از بیماری دیابت می‌تواند سودمند باشد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر حاصل طرح‌نامه دانشجویی مصوب دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد (تهران) در سال ۱۳۸۸ است. در ضمن نویسندگان مقاله، مراتب تشکر وافر خود را از سرکار خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد و سرکار خانم مریم شرایلی کارشناس گروه پاتولوژی برای کمک به انجام آزمایش‌ها اعلام می‌کنند.

سطح برخی مارکرها نشان می‌دهد که بهترین آنها، مالون دی آلدئید است (۱۹). با توجه به اینکه استرس اکسیداتیو به‌علت تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن بوده، این مواد به‌دنبال کامل کردن مدار الکترونی خود هستند، مواد تشکیل‌دهنده سلول از جمله ساختارهای پروتئینی و لیپیدی آسیب‌دیده که این با افزایش آزاد شدن یکسری آنزیم‌ها به‌داخل خون، خود را نشان می‌دهد که در این رابطه سطح دو آنزیم کبدی و کلیوی آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز در داخل خون افزایش می‌یابد (۲۰)؛ همچنین، مطالعات مختلف نشان‌داده‌اند که افزایش قند خون در دیابت، یکی از علل اصلی افزایش استرس اکسیداتیو است (۲۱، ۲۲). در بررسی حاضر نیز افزایش سطح این آنزیم‌ها در سرم موش‌های دیابتی و افزایش سطح بافتی مالون دی آلدئید مشاهده شد که این مورد با گزارش‌های قبلی همخوانی دارد (۲۲، ۲۳).

در این بررسی، تجویز هسپرتین به مدت یک ماه، کاهش سطح استرس اکسیداتیو در دو بافت قلب و کبد و کاهش سطح سرمی دو آنزیم آسپاراتات و آلانین آمینوترانسفراز را موجب‌گردید. بخشی از آثار سودمند هسپرتین در تحقیق حاضر را می‌توان به تأثیر کاهش-دهندگی استرس اکسیداتیو آن به‌علت داشتن خاصیت آنتی اکسیداتیو و تقویت‌کنندگی سیستم حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن نسبت داد (۸)؛ در این خصوص، نشان‌داده‌شده که فلاونوئیدها نظیر هسپرتین می‌توانند افزایش فعالیت آنتی اکسیدانت‌ها در بدن و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو را سبب‌شوند (۸، ۳) که بدین ترتیب می‌توانند کاهش پراکسیداسیون لیپیدی را به‌دنبال داشته‌باشند (۳) و این خود می‌تواند کاهش سطح مالون دی آلدئید در دو بافت کبد و قلب و سطح سرمی آلانین آمینوترانسفراز در بررسی حاضر را نیز تا حدی توجیه می‌کند؛ بخش دیگر اثر سودمند

منابع

1. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes Mellitus: Complications and therapeutics. *Med Sci Monit* 2006; 12: RA130-47.
2. Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatment of diabetes mellitus: An overview. *Cell Mol Biol* 2003; 49: 635-9.
3. Shapiro K, Gong WC. Natural Products Used For Diabetes. *J Am Pharm Assoc* 2002; 42: 217-226.
4. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G.
5. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2010 Spring;7(1):15-25 .
6. Descorbeth M, Anand-Srivastava MB. Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of Gq/11alpha proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2010, in press.
7. Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res*. 2010 ;2: 316-31.
8. Pazdro R, Burgess JR. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. *Mech Ageing Dev*. 2010; 131: 276-86.
9. Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res*. 2005;25:3367-74.
10. Aranganathan S, Panneer Selvam J, Nalini N. Hesperetin exerts dose dependent chemopreventive effect against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Invest New Drugs*. 2009; 27(3): 203-13.
11. Monforte MT, Trovato A, Kirjavainen S, Forestieri AM, Galati EM, LoCurto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid (note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rats. *Farmaco*. 1995;50:595-599.
12. Bok SH, Lee SH, Choi MS. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr*. 1999;129:1182-1185.
13. Borradaile NM, Carroll KK, Kurowska EM. Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperetin and naringenin. *Lipids*. 1999;34:591-8.
14. Kuppusamy UR, Das NP. Antilipolytic action of hesperetin in rat adipocytes. *Planta Med*. 1993;59:508-12.
15. Cha JY, Cho YS, Kim I, Anno T, Rahman SM, Yanagita T. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr*. 2001;56:349-58
16. Choi EJ, Ahn WS. Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. *Arch Pharm Res*. 2008;31:1457-62.
17. Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, Chung JH, Yun YP. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis*. 2007;194:144-52.
18. Akiyama S, Katsumata S, Suzuki K, Nakaya Y, Ishimi Y, Uehara M. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of hesperidin and cyclodextrin-clathrated hesperetin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2009;73(12):2779-82.
19. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. Mechanistic insights into diabetes mellitus and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2007;14(16): 1729-38.
20. Wei W, Liu Q, Tan Y, Liu L, Li X, Cai L. Oxidative stress, diabetes, and diabetic complications. *Hemoglobin* 2009; 33(5):370-7
21. Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9(6): 771-9.
22. Rahangdale S, Yeh SY, Malhotra A, Veves A. Therapeutic interventions and oxidative stress in diabetes. *Front Biosci* 2009;14: 192-209.
23. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008; 52(7): 1096-105
24. Lopes JP, Oliveira SM, Soares Fortunato J. Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications. *Acta Med Port* 2008; 21(3): 293-302.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Eighteenth Year,
No.89
October, November
2010*

Received: 7/9/2010

Last revised: 18/12/2010

Accepted: 22/12/2010

The effect of hesperetin on serum level of aspartate and alanine aminotransferase and hepatic and cardiac level of malondialdehyde in diabetic rats

Jamshid Narenjkar¹, Mehrdad Roghani^{2*}, Mehdi Shekouhi³

1. Associate Professor- Department of Pharmacology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Professor - Department of Physiology, School of Medicine and Medicinal Plant Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.
3. School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Diabetes mellitus accompanies increased malondialdehyde as a marker of oxidative stress and increased serum level of aspartate and alanine aminotransferase due to tissue damage. Due to antidiabetic effect of hesperetin, this study was done to evaluate its effect on level of these factors in diabetes.

Materials and Methods: Male rats (n = 32) were divided into control, treated control, diabetic, and treated diabetic groups. For induction of diabetes, streptozotocin at a dose of 60 mg/kg (i.p) was injected. Hesperetin was administered at a dose of 10 mg/kg/day for 4 weeks one week post-experiment. Serum levels of aspartate and alanine aminotransferase were measured before the study and at the end of the study. In addition, level of malondialdehyde (MDA) was measured in liver and heart tissues.

Results: A significant increase in serum level of aspartate and alanine aminotransferase ($p < 0.05-0.01$) was observed in diabetic rats and hesperetin treatment significantly reduced only serum level of alanine aminotransferase ($p < 0.05$). In addition, diabetes was followed by increased level of MDA in liver and heart tissues ($p < 0.01$) and hesperetin treatment significantly reduced MDA level in these tissues ($p < 0.05$).

Conclusion: Treatment with hesperetin could attenuate serum level of alanine aminotransferase and oxidative stress in hepatic and cardiac tissues, as indicated by a lower tissue level of MDA.

Key words: Hesperetin, Diabetes mellitus, Aminotransferase, Malondialdehyde