مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه
دوره ۱۲. شماره ۳. پاییز ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

بررسی اثر عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و کلیوی در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان

راهله رهباریان[1]، جلال شگفته[1]

۱.گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت:
۱۴۰۳/۰۶/۰۶

تاریخ پذیرش:
۱۴۰۳/۰۹/۱۴

کلیدواژه‌ها:
گیاه حرا، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کلیه، دیابت، نفروپاتی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه محفوظ است.

چکیده

زمینه و هدف: نفروپاتی دیابتی، یکی از عوارض جانبی ناشی از ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو حاصل از تولید رادیکال‌های آزاد در طی هیپرگلیسمی ناشی از دیابت نوع ۱ می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های کلیوی در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان انجام‌گرفته است.

روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار که به‌صورت تصادفی ساده به ۴ گروه مساوی شاهد، شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تخصیص داده شدند و مورد بررسی قرار گرفتند. مدل دیابت تجربی در گروه شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا، با یک‌بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات القاء گردید. در پایان دوره درمان، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های کلیوی بافت کلیه مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و نیز کاهش معنی‌دار مالون دی آلدئید در گروه دیابتی وابسته به دوز تزریقی ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد دیابتی بود ($p<۰/۰۵$)، درحالی‌که ارزیابی‌های بیوشیمیایی این دو گروه، حاکی از کاهش معنی‌دار میزان اوره خون، نیتروژن اوره خون، اوریک‌اسید و کراتینین و همچنین افزایش معنی‌دار آلبومین بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: گیاه حرا با کاهش هیپرگلیسمی ناشی از دیابت توانست سطح بین رادیکال‌های آزاد و سیستم ذاتی دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن را تا حدودی به شرایط تعادل نزدیک کند.

نویسنده مسئول: راهله رهباریان، تهران،دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
آدرس پست الکترونیک: a_rahbarian@pnu.ac.ir

مقدمه

دیابت ملیتوس به گروهی از بیماری‌های متابولیک اطلاق می‌شود که به چهار گروه دیابت نوع ۱، ۲، بارداری و انواع خاص طبقه‌بندی می‌شود. ویژگی بارز آن افزایش گلوکز خون و بروز علائم کلاسیک مانند پلی اوری[1]، پلی دیسپی[2]، خستگی و از دست دادن عملکرد، کاهش وزن غیرقابل توضیح، اختلالات بینایی و حساسیت به عفونت‌ها است (۱). دیابت نوع ۱، بدن با اختلال در ترشح انسولین به دلیل تخریب سلول‌های β لوزالمعده عمدتاً باواسطه ایمونولوژیک درحالی‌که نوع ۲، بدن با کاهش عملکرد انسولین روبه‌رو می‌شود (۲). دیابت با برجای گذاشتن تأثیر منفی بر اکثر مسیرهای متابولیک، از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو[3] در ایجاد و توسعه عوارض جانبی دیابت، کمک می‌کند. عوارض دیابت تقریباً تمام بافت‌های بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳).

استرس اکسیداتیو زمانی اتفاق می‌افتد که سطح رادیکال‌های آزاد بیشتر از سیستم آنتی‌اکسیدانی ذاتی در بدن شود. همچنین استرس اکسیداتیو نقش اساسی در پاتوفیزیولوژی عوارض مختلف دیابت از طریق پراکسیداسیون لیپیدی درنتیجه تهاجم رادیکال‌های آزاد به سمت لیپیدها دارد که درنهایت با کاهش حیات و مرگ سلولی همراه می‌شود (٤). کاهش سیالیت غشاء درنتیجه پراکسیداسیون لیپیدها، منجر به از بین رفتن ساختمان و عملکردهای آن می‌شود که دراین‌بین مالون دی آلدئید[4] که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد، افزایش‌یافته و از آن می‌توان به‌عنوان نشانگر زیستی در جهت تشخیص میزان استرس اکسیداتیو در بیماران مبتلابه دیابت مورداستفاده گیرد (٥).

اکثر سلول‌های زیستی، دارای یک مکانیسم دفاعی ذاتی، شامل آنزیم‌های مختلفی مانند سوپر اکسیددیسموتاز (SOD[5])، کاتالاز (CAT[6]) و گلوتاتیون پراکسیداز (GLT[7]) هستند که از سلول‌ها در برابر حمله رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. سوپر اکسید دیسموتاز، آنیون سوپر اکسید را به اکسیژن و پراکسید هیدروژن تبدیل کرده، آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز منجر به تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن شده که در متعادل نمودن سطح رادیکال‌های آزاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نقش مهمی را ایفا می‌کنند (٦). در بافت کلیه موش‌های دیابتی، میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی اندک و میزان مالون دی آلدئید، نیتریت و نیترات تا حد زیادی مشاهده می‌شود (۷).

نفروپاتی ناشی از دیابت، یکی از عوارض جانبی جدی در طول مدت ابتلا به دیابت شیرین می‌باشد؛ که از عوامل مهم در توسعه و پیشرفت آن می‌توان به استرس اکسیداتیو اشاره نمود. این عارضه عملکرد کلیه‌ها را در بیماران مبتلابه دیابت مختل می‌کند (۸). از علائم شاخص جهت تشخیص نفروپاتی دیابتی می‌توان به افزایش حجم کلیه‌ها، افزایش سطح آلبومین ادرار، کاهش عملکرد کلیه و سخت شدگی گلومرول‌ها و فیبروز گسترده توبول‌های کلیوی اشاره کرد. نفروپاتی دیابتی با علائم کلینیکال پُرادراری، دفع آلبومین و پروتئین شروع و آن‌قدر ادامه پیدا می‌کند تا درنهایت عملکرد کلیه به‌کلی از بین می‌رود (۹). در حال حاضر، درمان فعلی نفروپاتی دیابتی توسط بلاکرهای رنین-آنژیوتانسین انجام می‌گیرد که در مطالعات متعدد به‌وضوح نشان داده است که عملکرد کافی و رضایت‌بخش ندارند (۱۰). امروزه، استفاده از گیاهان دارویی در درمان اختلالات، به‌دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی افزایش‌یافته است. ازاین‌رو طبق تحقیقات صورت گرفته، متابولیت‌های طبیعی موجود در گیاه حرا می‌توانند در جلوگیری از صدمات اکسیداتیو در افراد مبتلابه دیابت و توسعه عوارض جانبی ناشی از آن مفید باشند (۳).

گیاه حرا بانام علمی *Avicennia marina* از خانواده *Avicenniaceae* (۱۱)، دارای متابولیت‌هایی مانند فیتوالکسین‌ها، استروئیدها، اسیدهای کربوکسیلیک، تانن‌ها،

[1] Polyuria
[2] Polydipsia
[3] Oxidative stress
[4] Malondialdehyde
[5] Superoxide dismutase
[6] Catalase
[7] Glutathione peroxidase

ایریدوئیدها، فلاونوئیدها وتری ترپن‌ها می‌باشند (۱۲)؛ که خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بیشتر به فلاونوئیدها و ترکیبات مشتق از آن‌ها برمی‌گردد (۱۳).

فلاونوئیدها[8]، بزرگ‌ترین گروه از پلی فنول‌ها می‌باشند که از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار هستند. ازاین‌رو، تحقیقات نشان داده است که مصرف گیاهان غنی از ترکیب‌های پلی فنولی، قادر به افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در خون می‌شود (۱۲). بااین‌حال مشخص‌شده است که تجویز عصاره برگ گیاه حرا به موش‌های صحرایی دیابتی، توانسته سطح سرمی گلوکز خون را کاهش و درنهایت از تشکیل رادیکال‌های آزاد جلوگیری و مانعی در مقابل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو تلقی گردد (۱۳).

این مطالعه، باهدف تعیین اثر عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های کلیوی موجود در بافت کلیه موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان انجام‌گرفته است.

روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه تحقیقات جانوری، گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد با کد اخلاقی IR. PNU. REC. 1403. 317 طراحی و اجرا گردید.

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ با محدوده سنی ۱۵-۱۴ هفته و محدوده وزنی ۱۶±۱۴۸ گرم نژاد ویستار[9] استفاده شد. حیوانات مدنظر در قفس‌های استاندارد پلی کربنات شفاف (رازی راد، ایران) با دمای محیطی ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۰-۳۵ درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند که در طول مدت آزمایش، حیوانات با آب به مقدار کافی توسط بطری‌های پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتری و غذای فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد (دانه‌داران توس، ایران) تغذیه می‌شدند. به‌منظور جلوگیری از خطاهای احتمالی ناشی از استرس و اضطراب حاصل از عدم سازش با محیط جدید، آزمایش پیش رو باگذشت حداقل ۱۰ روز بعد از استقرار حیوانات در محیط جدید آغاز گردید.

موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی ساده به ٤ گروه (در هر گروه ۸ سر موش صحرایی) (١٤)، شامل گروه شاهد سالم، گروه شاهد دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا (HPLC ≥ 95. 0%) تقسیم شدند. گروه‌های شاهد سالم و شاهد دیابتی به مدت ۳۰ روز و به‌صورت یک روز در میان به روش داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین (شرکت داروسازی ثامن، ایران) دریافت کردند. این عمل به‌منظور یکسان نمودن شوک حاصل از تزریق انجام گرفت. دو گروه دیابتی تحت تیمار، به مدت ۳۰ روز و به‌صورت یک روز در میان و به روش داخل صفاقی عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم دریافت نمودند.

برگ درخت گیاه حرا از سواحل شمالی جزیره قشم جمع‌آوری و توسط کارشناس مربوطه مورد تائید و پس از طی مراحل خشک شدن در سایه در دمای ۳±۳٦ درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب خرد شد. جهت تهیه عصاره، ۱۰۰ گرم از پودر خشک‌شده برگ گیاه حرا داخل بالن دستگاه سوکسله ریخته شد و به آن ۸۰۰ سی‌سی الکل اتیلیک ۸۰ درصد اضافه گردید. عصاره به‌دست‌آمده به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. پس از حذف حلال، عصاره با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تهیه و با نرمال سالین به‌عنوان حلال دارو، ترکیب و سپس به گروه‌های دیابتی تزریق گردید.

مدل تجربی دیابت (دیابت نوع ۱) در گروه‌های شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا با یک‌بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات (Sigma Aldrich, Germany) (۱۵)، به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم با استفاده از بافر سیترات (pH= ٥/٤) به‌عنوان حلال آلوکسان القاء گردید. به دلیل اطمینان از مطالعه ثمربخش بر روی دیابت مزمن و یکی از

[8] Flavonoids
[9] Wistar

عوارض جانبی آن یعنی نفروپاتی دیابتی، حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان و القاء دیابت تجربی، جهت تأیید آن از ورید دُمی، خون‌گیری صورت گرفت و قند خون توسط دستگاه گلوکومتر (Easy Gluco، South Korea) اندازه‌گیری شد. قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد (۱۶).

در پایان دوره درمان و به دنبال ۱۲ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با دی اتیل اتر (Merck، Germany) بی‌هوش و پس از خون‌گیری قلبی از آن‌ها، بافت کلیه از بدن خارج گردید (شکل ۱، پروتکل مطالعه نشان داده‌شده است).

پلاسما خون آن‌ها برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی نیتروژن اوره خون[10] (BUN)، اوره[11]، اوریک‌اسید[12]، کراتینین خون[13] (Cr) و آلبومین[14] جداسازی گردید.

بافت کلیه خارج‌شده، پس از شستشو با محلول سالین به همراه بافر تریس[15] به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایزر (IKA Ultra turrax T25 digital، Germany) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه شد. محلول هموژنیزه شده، سانتریفیوژ (Hermle Z366، Germany) گردید. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (سانتریفیوژ یخچال دار) انجام و از محلول ۰/۵ میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید[16] (Sigma-Aldrich، Germany) به‌عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد. پس از انجام سانتریفیوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا گردید، بخش زیرین رسوب‌کرده دور ریخته شد و از محلول شفاف رویی جهت سنجش استفاده گردید.

فعالیت سوپراکسیددیسموتاز با استفاده از کیت‌های شرکت راندوکس (Randox، England) و با کمک دستگاه فتومتر بیوشیمی (Stat Fax 2100، United States of America) اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده گردید. برای این منظور ۲ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به ٤۰ میکرولیتر از محلول هموژنیزه بافتی اضافه‌شده و به مدت ۵ دقیقه در دما آزمایشگاه انکوبه شد. سپس در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر و در مقابل معرف بلانک، جذب آن بررسی گردید. با انطباق درصد مهار روی منحنی استاندارد، فعالیت آنزیم به دست آمد و فعالیت آن برحسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین بافت (U/mg tissue protein) گزارش گردید (۷).

فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از کیت زل بایو (ZellBio، Germany) سنجش گردید. به‌طوری‌که در این واکنش کاهش جذب نوری در طول‌موج ۳٤۰ نانومتر اندازه‌گیری و جذب به‌دست‌آمده در فاکتور قیدشده در دستورالعمل کیت، ضرب گردید و میزان فعالیت آنزیم برحسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین بافتی (U/mg tissue protein) گزارش شد (۱۷).

فعالیت آنزیم کاتالاز، بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر اندازه‌گیری و واکنش با اضافه کردن ۳۰ میلی مولار پراکسید هیدروژن به حجم مناسبی از هموژن بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH =۷) انجام شد. سپس جذب نوری طی ۳ دقیقه در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر بررسی و فعالیت آنزیمی برحسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین بافتی (U/mg tissue protein) محاسبه شد (۱۸).

میزان مالون دی آلدئید، براساس واکنش آن با تیوباربیتوریک اسید در محلولی با دما ۹۰ درجه سانتی‌گراد با pH =۲-۳ به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. در اثر واکنش مربوطه در محلول موردنظر، رنگ صورتی ایجاد شد که این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس جذب نوری آن در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل معرف بلانک توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Aqualytic AL800، Germany) بررسی گردید. منحنی استاندارد بر اساس رقت‌های تترا اتوکسی پروپان تهیه و جذب‌های نوری به‌دست‌آمده با منحنی استاندارد تطبیق داده

[10] blood urea nitrogen
[11] urea
[12] uric acid
[13] creatinine
[14] Albumin
[15] Tris buffer
[16] Phenylmethylsulfonyl fluoride

شد. نتایج به‌صورت نانو مول در میلی‌گرم پروتئین بافتی (nmol/mg tissue protein) گزارش شد (۱۹).

اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲، تحلیل و با توجه به حجم پایین نمونه و کمی بودن نتایج به‌دست‌آمده، توسط آزمون شاپیرو-ویلک[17] با توجه به فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد.

از طرفی، جهت مقایسه میانگین، بین گروه‌های مورد آزمایش از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی حداقل تفاوت معنی‌دار فیشر[18] استفاده شد. همچنین نتایج به‌دست‌آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت خطای معیار میانگین±میانگین[19] گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (شکل-۲).

نتایج

تحلیل داده این مطالعه نشان داد که میزان قند خون ناشتا در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش‌یافته است (P<۰/۰۱) (جدول-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا، میزان قند خون ناشتا نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (**P**<۰/۰۱) (جدول ۱).

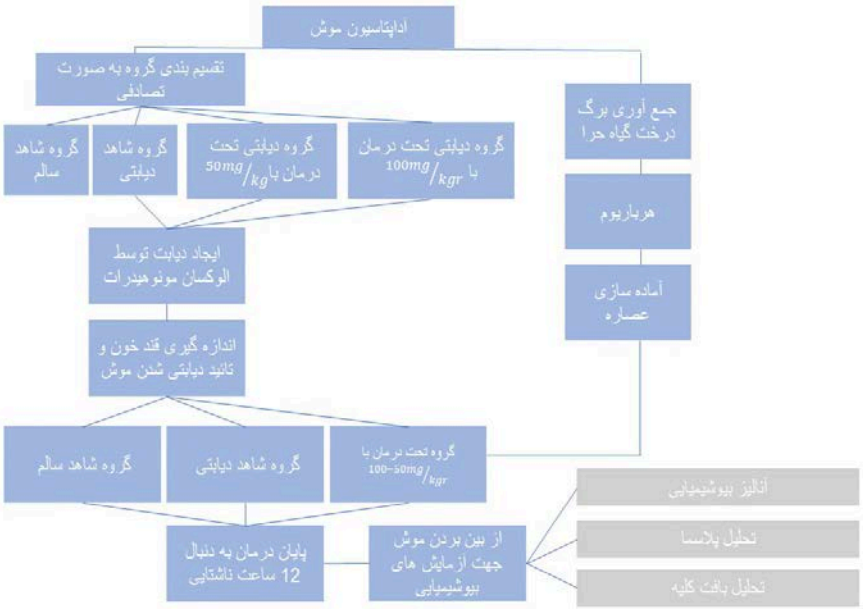
میزان فعالیت بافتی آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش و میزان مالون دی آلدئید افزایش یافت (**P**<۰/۰۵). در مقایسه با گروه شاهد دیابتی فعالیت بافتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش و میزان مالون دی آلدئید کاهش یافت (**P**<۰/۰۵). همچنین نتایج نشان داد فعالیت بافتی آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، نیز میزان مالون دی آلدئید بین گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵).

میانگین اوره خون در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ حرا، میزان اوره خون نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵)(نمودار-۱). مقایسه اوره خون دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵).

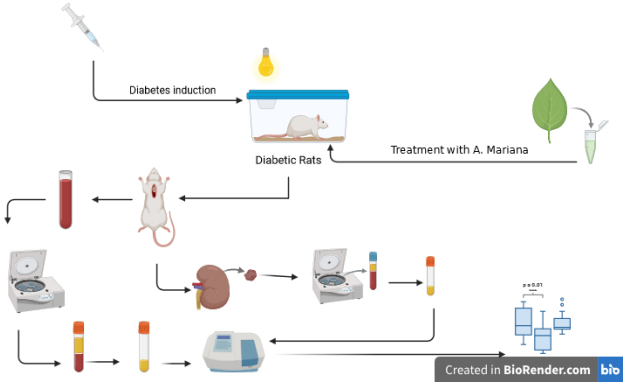
میانگین نیتروژن اوره خون در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ حرا، میزان نیتروژن اوره خون نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵)(نمودار-۱). مقایسه نیتروژن اوره خون دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵).

میانگین اوریک‌اسید در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ حرا، میزان اوریک‌اسید نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵) (نمودار ۱). مقایسه اوریک‌اسید دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵).

[17] Shapiro-Wilk Test
[18] Least significant difference
[19] Mean±SEM



شکل ۱: نمودار نامه دستورالعمل و مراحل گام‌به‌گام پروسه مطالعه تجربی، در جلوگیری و بهبود درمان نفروپاتی دیابتی با استفاده از تقویت شاخصه‌های آنتی‌اکسیدانی ناشی عصاره هیدرو الکلی گیاه حرا در نمونه‌های حیوانی دیابتی شده با آلوکسان مونوهیدرات



شکل-۲: نمای تصویری از مراحل آزمایش طراحی شده توسط نرم‌افزار BioRender

میانگین کراتینین در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ حرا، میزان کراتینین نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$)(نمودار-۱). مقایسه کراتینین دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت آماری میانگین آلبومین در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) (نمودار-۱). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ حرا، میزان آلبومین نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$)(نمودار-۱). مقایسه آلبومین دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱: میانگین سطح قندخون ناشتا، مالون دی آلدئید، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون اس ترانسفراز بافت کلیه تحت تیمار با عصاره حرا به تفکیک گروه

گروه	شاهد سالم	شاهد دیابتی	دیابتی تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره حرا	دیابتی تیمار با غلظت ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره حرا
	انحراف معیار±میانگین	انحراف معیار±میانگین	انحراف معیار±میانگین	انحراف معیار±میانگین
قندخون ناشتا (mg/dl)	۸۱±٦	۲٦۹/٦٦±۱۳/۰٤	۱۸۸/۳۳±۱۲/۰۵	۱٤۹±۱۱/۰۸
مالون دی آلدئید (nmol/mg)	۱/۷±۰/٤۰	۷/٦±۰/۷۵	۵/۵٦±۱/۳	۳/۸٦±۰/۹
سوپراکسید دیسموتاز (nmol/mg)	۳/۳۳±۰/٦٦	۱/٦۰±۰/۵۱	٤/۱٦±۰/۸۰	۵/۰۳±۱/۷۱
کاتالاز (nmol/mg)	۳/۲۳±۰/٤۱	۱/٤۳±۰/٤۹	۳/۷۰±۱/٦	٤/۸۰±۰/۵
گلوتاتیون اس ترانسفراز (nmol/mg)	۳/٤۳±۰/۹٦	۱/۵۳±۰/٦۸	۳/٤۳±۰/۵۱	٤/٤۰±۰/۵۰

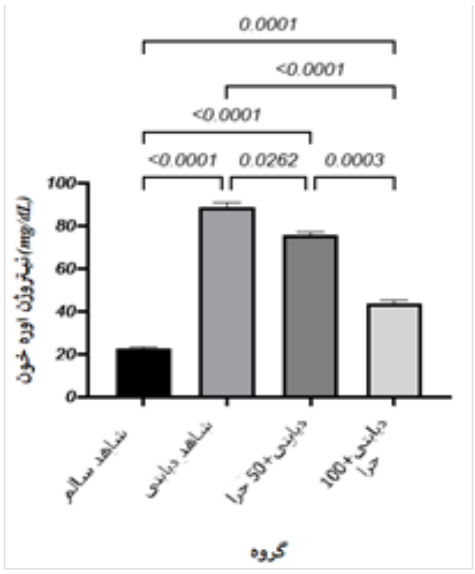
بحث

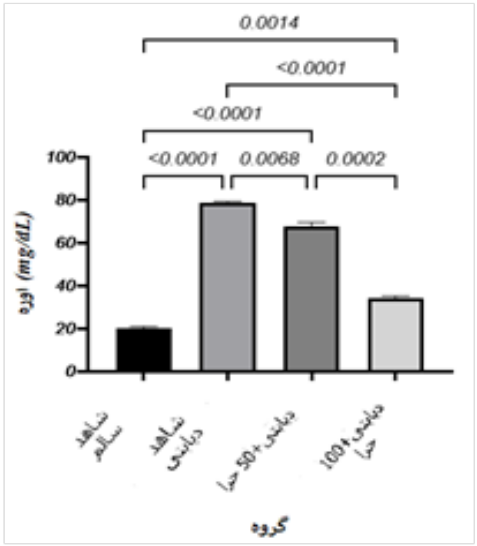
مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و کلیوی در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان را موردبررسی قرارداد. نتایج حاکی از مطالعات بیوشیمیایی این پژوهش، نشان داد که علاوه بر آشکار شدن دیابت، عارضه کلیوی دیابت نیز در نمونه‌های موردمطالعه ظهور پیداکرده است و درتمامی شاخصه‌های موردمطالعه، در بین گروه‌های شاهد سالم و شاهد دیابتی تفاوت معناداری وجود دارد.

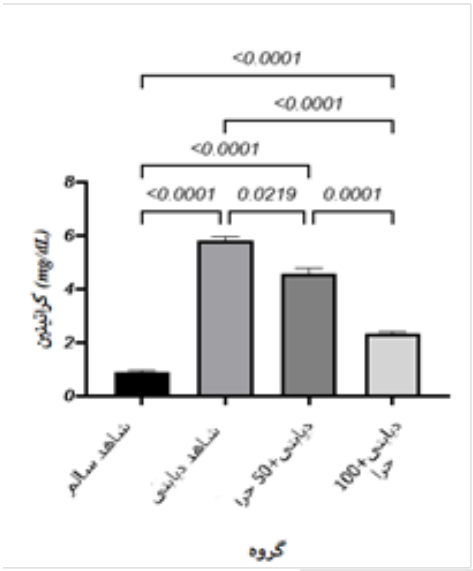
مدل تجربی القاء دیابت در نمونه‌های موردمطالعه توسط آلوکسان مونوهیدرات به‌صورت یک‌بار تزریق داخل صفاقی صورت پذیرفت. نظر به اینکه مطالعات در نمونه‌های حیوانی موردمطالعه در جهت عوارض ثانویه دیابت نظیر نفروپاتی، مدل پذیرفته‌شده استرپتوزوسین می‌باشد (۲۰)، اما در مطالعه حاضر مدل تجربی القاء دیابت توسط آلوکسان مونوهیدرات به‌عنوان مدل موردمطالعه، موردانتخاب قرار گرفت: چراکه آلوکسان، منجر به هیپرگلیسمی در سطح سرمی خون می‌گردد، درحالی‌که القاء دیابت توسط استرپتوزوسین بیشتر بر سطح گلوکز مغز، اثر می‌گذارد (۲۱).

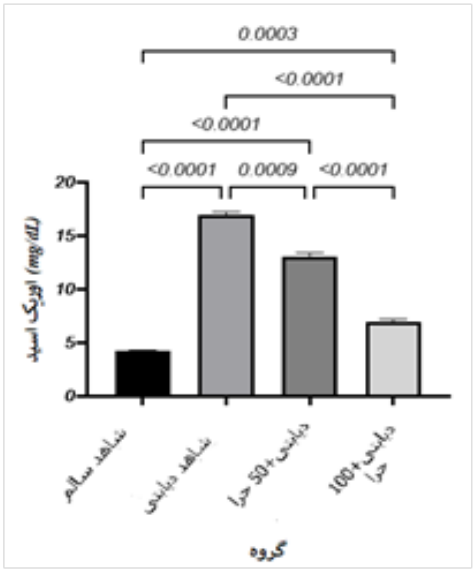
شواهدی وجود دارد که دیابت با ایجاد هیپرگلیسمی منجر به افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و درنهایت باعث تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت کلیه می‌گردد (۱۲). با توجه به اینکه نتایج تحقیقات اخیر در دیابت نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار سطح فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و نیز افزایش معنی‌دار سطح مالون دی آلدئید درنتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. این یافته‌ها، گزارش‌ها را متوجه افزایش سطح رادیکال‌های آزاد داخل سلولی و تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن که درنتیجه دیابت مزمن به وقوع می‌پیوندند، کرده است (۱۲). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج تحقیقات مشابهی که تاکنون انجام‌شده مطابقت دارد.

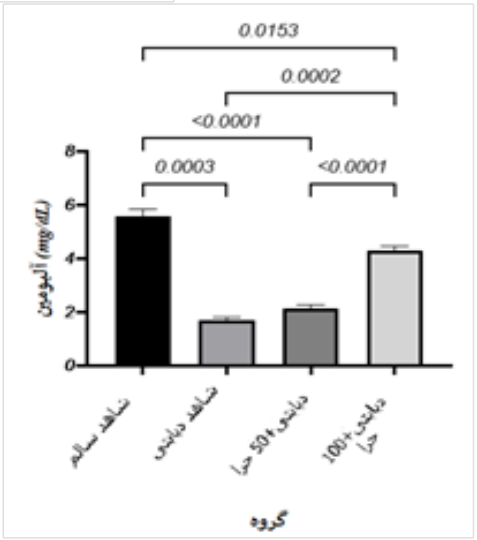
یکی از عوارض جانبی دیابت، نفروپاتی می‌باشد (۲۲). یافته‌های اخیر حاکی از آن است که هیپرگلیسمی در بیماران مبتلابه











نمودار ۱: میانگین سطح اوره، نیتروژن اوره خون، اوریک‌اسید، کراتینین و آلبومین بافت کلیه تحت تیمار با عصاره حرا به تفکیک گروه‌های موردمطالعه (p<۰/۰۵).

دیابت، منجر به القاء یکسری از واکنش‌های آبشاری و پشت سر هم می‌گردد که در طی آن منجر به ۱. عدم تعادل بیوشیمیایی در واکنش‌های اکسیداسیون احیاء، ۲. روند افزایشی فعالیت آنزیم آلدوز ردوکتاز (چراکه سلول‌های کلیوی برای برداشتن گلوکز نیازی به گیرنده انسولین ندارند و زمانی که گلوکز توانایی ورود به سلول‌ها را درنتیجه کاهش ترشح انسولین نداشته باشد، میزان بیش‌ازحد آن، به کلیه‌ها ورود پیداکرده که درنتیجه، کلیه با فعال کردن مسیر تبدیل گلوکز به سوربیتول توسط آنزیم آلدوز ردوکتاز منجر به تجمع سوربیتول به‌عنوان یک توکسین در بافت کلیه می‌گردد؛ که درنهایت با کاهش مسیر میواینوزیتول و اختلال در متابولیسم فسفواینوزیتید منجر به کاهش فعالیت پمپ Na^+/K^+ ATPase می‌گردد. این موضوع، می‌تواند آغاز تأثیر مخرب این متابولیت جایگزین، در بافت کلیه باشد، ۳. پراکسیداسیون لیپیدی، ٤. روند افزایشی سوپر اکسیدهای میتوکندریایی که درنهایت منجر به ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در بدن می‌گردند (۵). تحقیقات، توصیه به مصرف مواد غنی از ترکیبات فنولی دارد. چراکه این ترکیبات، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. یکی از بزرگ‌ترین گروه ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها می‌باشند که به میزان قابل‌توجهی در برگ گیاه حرا وجود دارند (۱۲). خاصیت بالای ترکیبات فنولی به‌احتمال زیاد به وجود حلقه فنول در آن‌ها و برهمکنش رادیکال‌های آزاد با این حلقه می‌باشد. ازاین‌رو تا به امروز هنوز مکانیسم آن ناشناخته باقی‌مانده است.

تمامی علائم اولیه کلینیکال از جنبه بیوشیمیایی نفروپاتی در تحقیقات اخیر، گویای افزایش اوره خون، نیتروژن اوره خون، اوریک‌اسید و کراتینین و نیز کاهش آلبومین خون پس از چهار الی هشت هفته بعد از دیابتی شدن موش‌های صحرایی نژاد ویستار آغاز می‌گردد (۲۳). نظر به اینکه نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تزریق وابسته به دوز ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا علاوه برافزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درنتیجه افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باوجود تخلیه گلوتاتیون و نیز کاهش سطح مالون دی آلدئید بافتی درنتیجه تقویت دفاع سلولی علیه استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش سطح رادیکال‌های آزاد با حذف هیدروپراکسیدهای لیپیدی و هیدروژن پراکسید (۱۵)، گویای کاهش توسعه و پیشرفت نفروپاتی کلیوی، درنتیجه کاهش سطح رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از دیابت بود. همچنین این موضوع توانست کاهش سطح اوره خون، نیتروژن اوره خون، اوریک‌اسید و کراتینین و افزایش سطح آلبومین را به‌وضوح توصیف کند (۲٤). نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعات اخیر مطابقت داشته و همان‌طور در نمودار ۱ از نتایج مشاهده می‌شود، نشان از آن است که گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم با افزایش معنی‌داری از اوره خون، نیتروژن اوره خون، اوریک‌اسید و کراتینین و نیز کاهش معنی‌دار آلبومین مواجه هست و عکس این موضوع در گروه‌های تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه شاهد دیابتی مطرح است. علاوه بر تمامی این موارد، نتایج پژوهش حاضر گویای اختلاف معناداری بین دو گروه دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا می‌باشد، چراکه مطالعات بیانگر مصرف گلوکز و یا کاهش آزادسازی قندها از منابع ذخیره‌ای درنتیجه استفاده از عصاره برگ گیاه حرا به‌صورت وابسته به دوز بود. به‌احتمال زیاد این موضوع عامل اصلی ممانعت از پیشرفت نفروپاتی دیابتی بوده است.

با استفاده از نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش و مقایسه بین دو گروه دیابتی تحت تیمار با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا، می‌توان دریافت که فلاونوئیدهای موجود در عصاره هیدرو الکی برگ گیاه حرا، توانایی بالقوه‌ای را در جهت استفاده به‌عنوان درمان کمکی در کنار دیگر داروهای کنترل‌کننده و بهبوددهنده نفروپاتی دیابتی را از خود نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

هرچند که مکانیسم اثرگذاری عصاره هیدرو الکلی برگ گیاه حرا تاکنون مشخص نشده است ولی بااین‌وجود مطالعات در سطح تجربی حاکی از آن است که متابولیت‌های موجود در برگ این گیاه به‌ویژه فلاونوئیدها اثر خود را در کاهش هیپرگلیسمی ناشی از دیابت و تعدیل شاخصه‌های بیوشیمیایی دخیل در نفروپاتی دیابتی را به اثبات برساند. با توجه به این موضوع، با مطالعات و تحقیقات بیشتر در رابطه با نحوه اثرگذاری این عصاره، قطعاً می‌تواند یکی از هدف‌های اصلی در پیشگیری از پیشرفت و یا بهبودی دیابت و عارضه‌های ناشی از آن در طول زمان بیماری باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه پیام نور مرکز مشهد با کد IR. PNU. REC. 1403. 317 به ثبت رسیده است. بدین‌وسیله نویسندگان از کلیه افرادی که در مراحل نگارش این مقاله همکاری کردند، کمال تشکر و قدردانی رادارند.

تضاد منافع

در این پژوهش هیچ‌گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم‌پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع‌آوری داده‌ها، یا تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها: همه نویسندگان

(۲) تهیه پیش‌نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: همه نویسندگان

(۳) تائید نهایی دست‌نوشته پیش از ارسال به مجله: همه نویسندگان

References

1. Harreiter J, Roden M. Diabetes mellitus–Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2023). Wiener Klinische Wochenschrift. 2023;135(Suppl 1):7-17.
https://doi.org/10.1007/s00508-022-02122-y

2. Zaharia OP, Strassburger K, Strom A, Bönhof GJ, Karusheva Y, Antoniou S, et al. Risk of diabetes-associated diseases in subgroups of patients with recent-onset diabetes: a 5-year follow-up study. The lancet Diabetes & endocrinology. 2019;7(9):684-94.
https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30187-1

3. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Rezaee R, Sahebkar A. Oxidative stress induces renal failure: A review of possible molecular pathways. Journal of cellular biochemistry. 2018;119(4):2990-8.
https://doi.org/10.1002/jcb.26450

4. Girotti AW, Korytowski W. Cholesterol as a natural probe for free radical-mediated lipid peroxidation in biological membranes and lipoproteins. Journal of Chromatography B. 2016;1019:202-9.
https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.12.034

5. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. Physiol Rev. 2013;93(1):137-88.
https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2011

6. Darenskaya M, Kolesnikova La, Kolesnikov S. Oxidative stress: pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. Bull Exp Biol Med. 2021;171(2):179-89.
https://doi.org/10.1007/s10517-021-05191-7

7. Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Effect of chronic administration of Silymarin on oxidative stress markers in renal tissue of diabetic Rats. Journal of Gorgan University of Medical Sciences. 2012;14(2):10-6. [Persian]

8. Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions. Am J Kidney Dis. 1999;34(5):795-808.
https://doi.org/10.1016/S0272-6386(99)70035-1

9. Mariappan MM. Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes. Journal of Diabetes Research. 2012;2012(1):749812.
https://doi.org/10.1155/2012/749812

10. Pandey A, Tripathi P, Pandey R, Srivatava R, Goswami S. Alternative therapies useful in the management of diabetes: A systematic review. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 2011;3(4):504-12.
https://doi.org/10.4103/0975-7406.90103

11. Mirazi N, Movassagh S-N, Rafieian-Kopaei M. The protective effect of hydro-alcoholic extract of mangrove (Avicennia marina L.) leaves on kidney injury induced by carbon tetrachloride in male rats. Journal of Nephropathology. 2016;5(4):118. [Persian]
https://doi.org/10.15171/jnp.2016.22

12. Rahbarian R. The Effect of Avicennia marina Flavonoids on Bax, Bcl-2 and Stress Oxidation Indicators of Epididymis Sperm in Type 1 Diabetic Rats. Journal of Animal Biology. 2024;16(2):175-87. [Persian]

13. FATHI MH, Mokhtari M, Kamaei L, Ahangarpour A. Effects of Avicennia Marina leaves aqueous and hydro alcoholic extract on streptozotocin-induced diabetic male rats. 2012. [Persian]

14. Ahmadi-Noorbakhsh S. Sample size calculation for animal studies -with emphasis on the ethical principles of reduction of animal use.

Pejouhesh dar Pezeshki (Research in Medicine). 2018;42(3):144-53. [Persian]

15. Esmaeili Sabzevar H, Rahbarian R, Saleh Moghadam M, Sadoughi SD. Effect of aqueous extract of mangrove leaves (Avicennia marina) on the antioxidant enzyme activities of the ovarian tissue in diabetic rats. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2017;5(1):32-41. [Persian]

16. Sadoughi SD, Chamipa M. Effects of aqueous extract of Holothuria arenicola and low frequency electromagnetic field on serum insulin, glucose and beta-amyloid (Aβ1-42) in diabetic rats. Feyz Medical Sciences Journal. 2016;20(1):1-10. [Persian]

17. Sameni HR, Sameni H, Tabriziamjad M, Bandegi AR, Yousefi B, Taherian A. Effects of hydroalcoholic extract of Propolis on oxidative stress indices of rat fetal brain induced by chronic prenatal stress. Koomesh. 2014;15(4):482-92. [Persian]

18. Zare'i Mahmoudabadi A, Rasouli Vani J, Saberi M. Evaluating oxidative stress factors induced by chlorpyrifos poisoning in plasma of wistar rat. SSU_Journals. 2014;22(2):1079-89.

19. Malek-Mohammadi R, Roghani M, Salami M. The effect of aqueous extract of Melissa officinalis on the oxidative stress indices in the midbrain tissue. Feyz Medical Sciences Journal. 2015;19(1):8-14. [Persian]

20. Shokrzadeh M, Jahani M, Vafaeipour Z, Shaki F. Protective effect of Nanoceria against renal mitochondrial damage in Streptozocine-induced diabetic mice. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2016;25(132):258-69. [Persian]

21. Leme JACdA, Gomes RJ, Mello MARd, Luciano E. Moderate physical training increases brain insulin concentrations in experimental diabetic rats. 2008.

22. Radi R, Denicola A, Morgan B, Zielonka J. Foreword to the Free Radical Biology and Medicine Special Issue on¨ Current fluorescence and chemiluminescence approaches in free radical and redox biology¨. Free Radic Biol Med. 2018;128:1-2.

https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.027

23. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012(1):428010.

https://doi.org/10.1155/2012/428010

24. Dabla PK. Renal function in diabetic nephropathy. World J Diabetes. 2010;1(2):48.

https://doi.org/10.4239/wjd.v1.i2.48

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2024, Volume 12, No. 3: 27-39.

Original article

Studing the effect of hydroalcoholic extract of Avicennia marina leaves on antioxidant and renal indices in alloxan-induced diabetic rats

Raheleh Rahbarian[1], Jalal Shegofte[1]

1. Department of Biology, Faculty of basic Science, Payame Noor University, Tehran, Iran

Corresponding author: Raheleh Rahbarian, Department of Biology, Faculty of basic Science, Payame Noor University, Tehran, Iran**. Email: a_rahbarian@pnu.ac.ir**

Submitted: 27 August 2024 Accepted: 4 December 2024

Keywords:

Avicennia marina, antioxidant enzymes, kidney, diabetes, nephropathy

Abstract

Background & Aim*:* Diabetic nephropathy is a side effect of oxidative stress caused by the production of free radicals during hyperglycemia in individuals with type 1 diabetes. The purpose of this study was to investigate the impact of a hydroalcoholic extract of Avicennia marina leaves on antioxidant levels and renal function in diabetic rats treated with alloxan.

Methods**:** In this study, 32 adult male Wistar rats were randomly divided into four equal groups: a control group, a diabetic control group, and two diabetic groups treated with hydroalcoholic extract of Avicennia marina leaves at concentrations of 50 and 100 mg/kg. The experimental diabetes model was induced in the diabetic control group and the treated diabetic groups through a single intraperitoneal injection of alloxan monohydrate. At the end of the treatment period, we assessed the activity of antioxidant enzymes and renal indices of kidney tissue.

Results**:** The results of this study revealed a significant increase in the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase enzymes, along with a significant decrease in malondialdehyde in the diabetic groups that received doses of 50 and 100 mg/kg compared to the diabetic control group ($P<0.05$). Additionally, biochemical evaluations indicated a significant decrease in blood urea, blood urea nitrogen, uric acid, and creatinine, as well as a significant increase in albumin ($P<0.05$).

Conclusion**:** The Avicennia marina plant reduced hyperglycemia caused by diabetes, and brought the levels of free radicals and the body's innate antioxidant defense system closer to balance.

How to Cite this Article: Rahbarian R, Shegofte J. Studing the effect of hydroalcoholic extract of Avicennia marina leaves on antioxidant and renal indices in alloxan-induced diabetic rats**.** Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2024;12(3):27-39.

Copyright © 2024 Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.