Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

مقاله پژوهشی

بررسی اثر کروسین بر روی سطوح سرمی گلوکز، انسولین و فاکتورهای کلیوی (اوره، کراتینین و بتادومیکروگلوبولین) در رت‌های سالم و دیابتی

حامد صمدی[۱]، شهرام جوادی[۲×]، سیامک عصری[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۴/۰۸/۰۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: به‌منظور مطالعه نقش مفید کروسین در بیماری دیابت ملیتوس و عوارض کلیوی آن، مقادیر سرمی گلوکز، انسولین، اوره، کراتینین وبتا دو میکروگلوبولین (β2M) در رت‌های سالم و دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (۴۲ mg/kg) به دنبال تجویز کروسین اندازه‌گیری شد.

مواد و روش کار: در مطالعه حاضر، ۴۵ سر موش صحرایی (رت) نر به ۹ گروه ۵ تایی شامل: گروه کنترل، گروه کنترل دیابتی، گروه سالم و دیابتی با دریافت کروسین (به مقدارmg/kg ۴۰ و ۱۰)، گروه سالم و دیابتی با دریافت انسولین، گروه دیابتی با دریافت هم‌زمان کروسین (10 mg/kg) و انسولین در یک دوره ۲۰ روزه، تقسیم شدند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار مقادیر β2M، اوره، کراتینین و گلوکز در گروه کنترل دیابتی در قیاس با گروه کنترل سالم بود. مقادیر β2M و گلوکز گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده کروسین (10,40 mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌داری نشان داد. سطوح سرمی اوره و کراتینین نیز در گروه‌های دیابتی درمان شده با کروسین کاهش یافت، ولی معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: کروسین در بیماری دیابت و کاهش عوارض کلیوی دارای نقش حفاظتی بوده و سطوح سرمی β2M، گلوکز، اوره و کراتینین را در رت‌های دیابتی کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد اثرات سودمند کروسین روی سطوح سرمی β2M و گلوکز در رت‌های دیابتی با تحریک ترشح انسولین و بهبود مقاومت به انسولین اعمال می‌گردد.

کلمات کلیدی: دیابت ملیتوس، استرپتوزوتوسین، کروسین، انسولین، بتا دو میکروگلوبولین

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و ششم، شماره نهم، ص ۸۱۲-۸۰۲، آذر ۱۳۹۴

آدرس مکاتبه: گروه بیماری‌های داخلی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۳۷۲۰۵

Email: S.Javadi@urmia.ac.ir

مقدمه

بیماری دیابت بسیاری از ارگان‌های بدن را تحت تأثیر قرار داده و ناکارآمد می‌کند، ولی از مهم‌ترین ضایعات دیابت، بیماری‌های کلیوی است. نفروپاتی دیابتی از عوارض عروقی پیش‌رونده و از شایع‌ترین دلایل شروع مرحله نهایی بیماری کلیوی است که به دلیل آنژیوپاتی مویرگ‌های گلومرولی در دیابت ملیتوس طی طولانی‌مدت ایجادشده و به ناتوانی و مرگ‌ومیر بیماران دیابتی منجرمی شود (۱, ۲) به‌طور متوسط ۳۰ درصد از بیماران مبتلا به دیابت وابسته به انسولین دچار نارسایی کلیوی می‌گردند (۳). افزایش رادیکال‌های آزاد به‌عنوان محرک قوی تولید فاکتورهای التهابی در ایجاد نفروپاتی نقش مهمی دارند (۴). تخریب بافت کلیه (هیپرتروفی گلومرول‌ها و توبول‌پروگزیمال و آتروفی سلول‌های پوششی توبول دیستال) در موش‌های صحرایی دیابتی القاشده با استرپتوزوتوسین مشاهده گردیده است (۵). اندازه‌گیری سطوح سرمی اوره و کراتینین روشی رایج برای تشخیص بیماری‌های کلیه می‌باشد (۶). در مطالعه‌ای افزایش معنی‌دار سطوح سرمی اوره و کراتینین در خرگوش‌های دیابتی گزارش گردیده که در هفته دوازدهم به حداکثر مقدار خود رسیده است (۷) به‌طور ویژه و اختصاصی بتا دو میکروگلوبولین (β2M) یک متابولیت برای ارزیابی فعالیت کلیه‌هاست، چراکه ۹۷ درصد این پروتئین توسط گلومرول‌ها فیلتر می‌شود(۸) و مقادیر

[۱] دانش آموخته دکترای دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[۲] دانشیار گروه بیماری‌های داخلی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۳] دانشیار گروه بیماری‌های داخلی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

طبیعی آن در سرم انسان کم‌تر از mg/dl ۰/۲ است (۹). یکی از نکات بسیار مهم در بیماری دیابت، تشخیص به‌موقع این بیماری و جلوگیری از پیشرفت عوارض خطرناک آن نظیر نفروپاتی می‌باشد. اهمیت β۲M در تشخیص زودهنگام بیماری کلیوی در مطالعات قبلی ثابت شده است و مشخص گردیده که مقادیر سرمی β۲M قبل از اوره و کراتینین افزایش می‌یابد (۷). در بیماری کلیوی نوزادان افزایش دفع ادراری β2M به‌عنوان یک شاخص درگیری توبولار شناخته شده است (۱۰). در مطالعه‌ای نقش β2M به‌عنوان یک شاخص بیولوژیکی در بیماری شریان‌های محیطی به اثبات رسیده است (۱۱) در مطالعه‌ای دیگر میزان β2M موجود در بزاق بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیوی سنجیده شده و نتیجه‌گیری شده که میزان β2M موجود در بزاق می‌تواند به‌عنوان یک روش قابل‌اطمینان برای ارزیابی سطح β2M خون جهت پیش‌بینی نارسایی مزمن کلیوی ناشی از آمیلوئیدوز قلمداد گردد (۱۲) از طرفی مشخص‌شده β2M می‌تواند به‌عنوان هورمون رشد استخوانی در تنظیم فعالیت سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست استخوانی ایفای نقش نماید و می‌تواند به‌عنوان شاخصی بیولوژیکی در متابولیزم استخوان در شرایط تکثیر شدید سلول‌های استخوانی مطرح گردد (۱۳). در مطالعه‌ای مشخص گردیده کروسین سبب افزایش میزان انسولین سرمی در رت‌های دیابتی می‌گردد (۱۴) اخیراً نقش حفاظتی کروسین در کاهش صدمات هیستوپاتولوژیکی نظیر احتقان، التهاب و نکروز توبولار در بافت کلیه رت‌های دیابتی گزارش گردیده است (۱۵).

استفاده طولانی‌مدت از داروهای شیمیایی برای درمان دیابت و عوارض ناخواسته این داروها باعث شده است تا توجه محققان به سمت داروهای گیاهی که طبیعی بوده و عوارض جانبی کم‌تری دارند معطوف گردد. کروسین به‌عنوان جزء بیولوژیکی اصلی و فعال زعفران شناخته شده است (۱۶) امروزه مشخص‌شده که زعفران می‌تواند حساسیت به انسولین را افزایش داده و مقادیر گلوکز سرم را کاهش دهد (۱۴, ۱۷) و دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد (۱۸). با توجه به مطالعات فوق که بیانگر نقش مثبت کروسین در بیماری دیابت و کاهش عوارض این بیماری است، به‌منظور بررسی نقش حفاظتی کروسین در کاهش عوارض کلیوی دیابت، هدف از انجام این مطالعه بررسی نقش کروسین بر میزان سطوح سرمی بتادومیکروگلوبولین، اوره و کراتینین در رت‌های سالم و دیابتی می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی تعداد ۴۵ سر موش صحرایی (رت) ویستار جنس نر، با وزن ۲۸۰-۲۵۰ گرم به مدت ۳ هفته جهت تطابق با محیط آزمایشگاه نگهداری شدند. حیوانات در ۹ گروه پنج‌تایی با درجه حرارت ۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی _ تاریکی ۱۲ ساعت (شروع روشنایی ساعت ۷ و شروع تاریکی ساعت ۱۹) در قفس پرورشی (تعداد ۵ سر موش در هر قفس) با آب، غذا و دسترسی آزاد نگهداری شدند (جدول ۱). پودرهای کروسین، استرپتوزوتوسین، انسولین، حلال‌ها ازجمله نرمال سالین و بافر سیترات با (PH=4.5) مورداستفاده قرار گرفت. پودر کروسین با نرمال سالین و پودر استرپتوزوتوسین (STZ) در بافر سیترات با (PH=4.5) حل شد. این مطالعه به‌صورت پایان‌نامه در جلسه شورای پژوهشی و کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به تصویب رسیده است.

جدول (۱): گروه‌بندی حیوانات

گروها	تزریقات
۱	تزریق داخل صفاقی نرمال سالین و بافر سیترات (pH=4.5)_گروه کنترل
۲	تزریق داخل صفاقی STZ با دوز mg/kg ۴۲ محلول در بافر سیترات (pH=4.5)
۳	تزریق داخل صفاقی کروسین با دوز mg/kg ۱۰ محلول در نرمال سالین
۴	تزریق داخل صفاقی کروسین با دوز mg/kg ۴۰ محلول در نرمال سالین
۵	تزریق زیر جلدی انسولین ۵ واحد بر kg وزن بدن محلول در نرمال سالین
۶	تزریق داخل صفاقی STZ برای ایجاد دیابت وکروسین 10mg/kg
۷	تزریق داخل صفاقی STZ برای ایجاد دیابت وکروسین 40mg/kg
۸	تزریق داخل صفاقی STZ برای ایجاد دیابت وتزریق زیر جلدی انسولین ۵ واحد بر kg وزن بدن
۹	تزریق داخل صفاقی STZ برای ایجاد دیابت وکروسین (10mg/kg) + تزریق زیرجلدی انسولین

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

روش ایجاد دیابت:

برای ایجاد دیابت ترکیب استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز 42 mg/kg bodyweight در بافر سدیم سیترات 0/1 M با pH برابر با4.5 حل شده به روش داخل صفاقی به رت ها تزریق گردید. برای تأیید دیابتی شدن حیوانات در روز سوم پس از تزریق STZ، میزان گلوکز خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر با مشخصات (Elegance- CTX12)ساخت کمپانی کانورجنت آلمان اندازه‌گیری شد. مقادیر گلوکز خون بالای 250 mg/dl به‌عنوان حیوان دیابتی در نظر گرفته شد. در غیر اینصورت حیوان دیگری جایگزین گردید.

روش خون‌گیری برای اندازه‌گیری گلوکز خون:

برای بررسی میزان گلوکز، در روز سوم پس از تزریق داخل صفاقی STZ خون‌گیری از دم انجام شد. برای اینکارهر حیوان جداگانه در یک قفس قرار گرفت و با سوزن شماره ۳۰ ضربه به نوک دم زده و یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتر قرارداده شد، میزان گلوکز خون از روی دستگاه قرائت شد.

روش خون‌گیری برای تهیه سرم:

برای خون‌گیری و تهیه سرم در روز ۲۰ پس از تزریق داخل صفاقی STZ، ابتدا حیوانات با تزریق کتامین و رامپون بیهوش شده با سر سوزن شماره ۲۳ به میزان حدود ۴ میلی لیتر از قلب خون گیری به عمل آمد. نمونه خون بلافاصله به لوله فاقد ماده ضد انعقاد منتقل گردیده و متعاقب لخته شدن درهمان روز سانتریفیوژ گشته (۳۵۰۰ دور به مدت 15 دقیقه) و سرم جداسازی شد.

نمونه‌های سرم تهیه شده در دمای ۷۰-، تا زمان شروع اندازه‌گیری گلوکزو انسولین، بتا-۲-میکروگلوبولین، اوره و کره آتینین فریز گردیدند. مقادیر گلوکز به‌عنوان یک اندیکاتور برای ارزیابی هیپرگلیسمی مورد سنجش قرار گرفت که مقادیر گلوکز بالای ۲۵۰mg/dl به‌صورت پایدار و مقادیر پایین انسولین در مقادیر نزدیک به صفرو غیر قابل اندازه‌گیری، مؤید ایجاد دیابت ملیتوس تیپ ۱ می‌باشد.

روش درمان با کروسین و انسولین:

انسولین در مقدار ۵ واحد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به روش زیر جلدی تزریق شد. تزریق داخل صفاقی کروسین به مقدار 10 و 40 mg/kg از روز سوم پس از تزریق داخل صفاقی STZ، به صورت یک روز در میان تا آخر دوره انجام شد. در درمان‌های توأم، کروسین ۱۰ mg/kg و انسولین ۵ واحد به‌صورت هم‌زمان و یکروز در میان تزریق گردید.

اندازه‌گیری انسولین:

سنجش انسولین با استفاده از روش Immunoenzymometric (TYPE 3) و کیت (Monobind Inc. Lake Forest, (CA92630, USA انجام گرفت.

ارزیابی مقادیر بتا-۲-میکروگلوبولین:

برای این کار از کیت الایزای β2M، ساخت شرکت Biotech آمریکا استفاده شد. هم زمان با انجام آزمایش بر روی نمونه‌ها، ست استاندارد برای کالیبره کردن نیز آزمایش گردید.

اندازه‌گیری اوره سرم:

سنجش اوره با روش آزمایش (Uv_test) و با استفاده از کیت تجاری اوره شرکت پارس آزمون انجام گرفت.

اندازه‌گیری کراتینین:

سنجش کراتینین با استفاده از کیت کراتینین ساخت شرکت پارس آزمون (به روش دستی) و دستگاه اسپکتوفتومتر Pharmacia انجام شد.

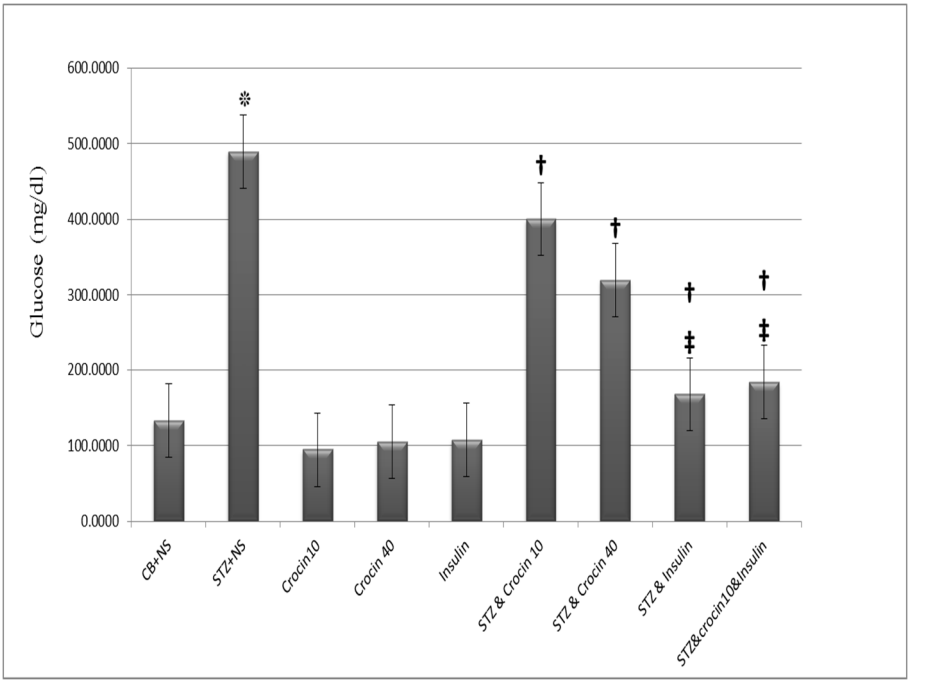
تجزیه و تحلیل داده‌ها:

آزمون آماری با استفاده از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۵ بررسی گردید. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای معیار بیان گردیدند. آنالیز واریانس یکطرفه و سپس پس آزمون Tukey جهت بررسی آماری استفاده گردید. مقادیر $P< 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تزریق داخل صفاقی STZ درمقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان گلوکز سرم خون گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان گلوکز نداد. تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن از افزایش میزان گلوکز خون ناشی از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین در روز ۲۰ پس از تزریق استرپتوزوتوسین به‌طور معنی‌دار جلوگیری کرد. تزریق زیر جلدی انسولین نیز در مقدار ۵ واحد به ازای یک کیلوگرم به‌طور معنی‌دار موجب جلوگیری از افزایش میزان گلوکز خون ناشی از استرپتوزوتوسین در روز ۲۰ پس از تزریق استرپتوزوتوسین شد. تزریق توام داخل صفاقی کروسین (۱۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) وزیر جلدی انسولین (۵ واحد به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) یک اثر جلوگیری کننده معنی‌دار نسبت به کروسین به تنهایی و نسبت به استرپتوزوتوسین در روز ۲۰ پس از تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد کرد. (نمودار ۱) .

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018



نمودار (۱): اثر تزریقات کروسین و انسولین بر میزان گلوکز خون در رت‌های سالم و دیابتی در روز ۲۰. داده‌ها در نمودار به صورت Mean ± SEM آورده شده‌اند.

*: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده CB + NS می‌باشد.

†: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده STZ + NS می‌باشد. ‡: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه‌های دریافت‌کننده STZ + Crocin (10 and 40 mg/kg) می‌باشد.

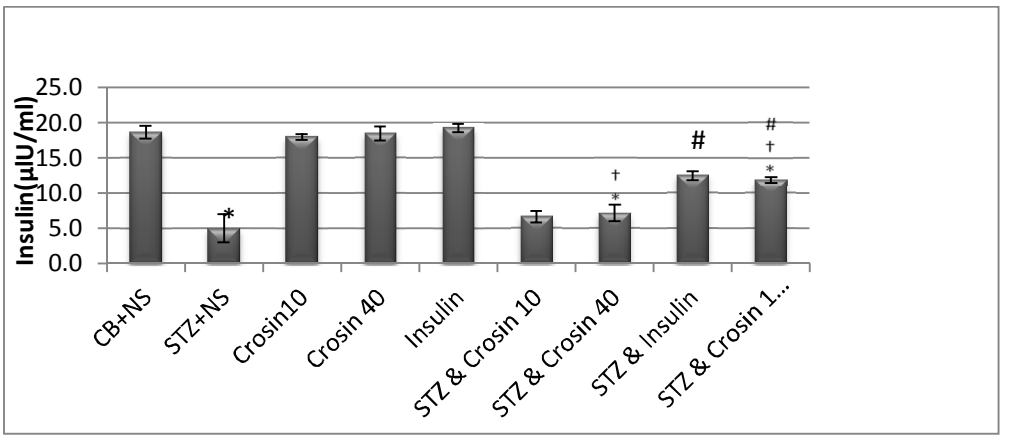
CB:Citrate Buffer:(بافر سیترات)،STZ:Streptozotocin: (استرپتوزوتوسین)،NS:Normal Saline: (سالین نرمال)

میزان انسولین خون پس از تزریق داخل صفاقی بافر سیترات و به دنبال آن تزریق داخل صفاقی سالین نرمال در روز ۲۰، ۲۶/ ± ۱۸/۷ میکروواحد در یک میلی‌لیتر سرم خون به دست آمد. تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین موجب کاهش میزان انسولین سرم در روز ۲۰ به ۰/۳۵±۵/۰۴ میکروواحد در یک میلی‌لیتر سرم خون شد. در رت‌های سالم، تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن و تزریق زیر جلدی انسولین در مقدار ۵ واحد به ازای یک کیلوگرم وزن بدن تغییر معنی‌داری در میزان انسولین سرم در روز ۲۰ پس از تزریق داخل صفاقی بافر سیترات ایجاد نکرد.

تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن از کاهش میزان انسولین سرم ناشی از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین به‌طور معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) جلوگیری کرد. تزریق زیر جلدی انسولین در مقدار ۵ واحد به ازای یک کیلوگرم به‌طور معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) موجب جلوگیری از کاهش میزان انسولین سرم ناشی از استرپتوزوتوسین درروز ۲۰ پس از تزریق استرپتوزوتوسین شد. اثر انسولین به‌طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) بیشتر از اثر کروسین ۱۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن در جلوگیری از کاهش انسولین سرم ناشی از استرپتوزوتوسین بود.

تزریق توام داخل صفاقی کروسین (۱۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) و زیر جلدی انسولین (۵ واحد به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) یک اثر جلوگیری کننده غیر معنی‌دار نسبت به انسولین به تنهایی و معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) نسبت به کروسین به تنهایی و نسبت به استرپتوزوتوسین در روز ۲۰ پس از تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد کرد (نمودار ۲).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018



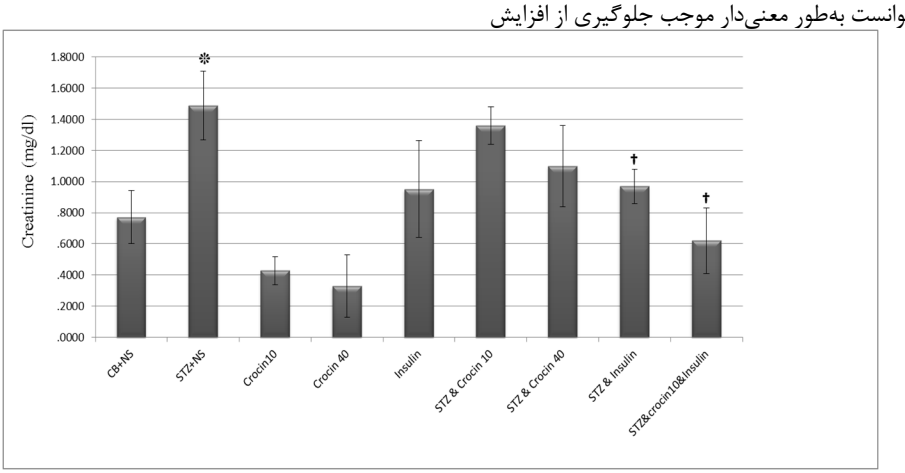
نمودار (۲): اثر تزریقات کروسین و انسولین بر میزان انسولین سرم در رت‌های سالم و دیابتی در روز ۲۰. داده‌ها در نمودار به صورت Mean ± SEM آورده شده‌اند. ❊: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (p < ۰/۰۵) با گروه دریافت‌کننده CB + NS می‌باشد. †: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (p < ۰/۰۵) با گروه دریافت‌کننده STZ + NS می‌باشد. ‡: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (p < ۰/۰۵) با گروه دریافت‌کننده STZ + Crocin (10 mg/kg) می‌باشد. #: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (p< 0.05)با گروه‌های دریافت‌کننده STZ + Crocin (10 and 40 mg/kg)می‌باشد.

CB:Citrate Buffer:(بافر سیترات) STZ:Streptozotocin:(استرپتوزوتوسین)

NS:Normal Saline: (سالین نرمال)IP:Intraperitoneal: (داخل صفاقی)

SC:Subcutaneous:(زیر جلدی)

در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی STZ درمقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان کراتینین گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در مقدار کراتینین سرم ایجاد نکرد. تزریق داخل صفاقی کروسین (۱۰ و ۴۰ mg/kg) نتوانست به‌طور معنی‌دار موجب جلوگیری از افزایش کراتینین سرم خون ناشی از تزریق STZ شود. تزریق به تنهایی انسولین (۵ واحد بر کیلوگرم) و تزریق توأم کروسین (۱۰ mg/kg) و انسولین از افزایش میزان کراتینین سرم ناشی از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌دار جلوگیری کرد (نمودار ۳).



نمودار (۳): اثر تزریقات کروسین و انسولین بر میزان کراتینین خون در رت‌های سالم و دیابتی در روز ۲۰. داده‌ها در نمودار به صورت Mean ± SEM آورده شده‌اند.

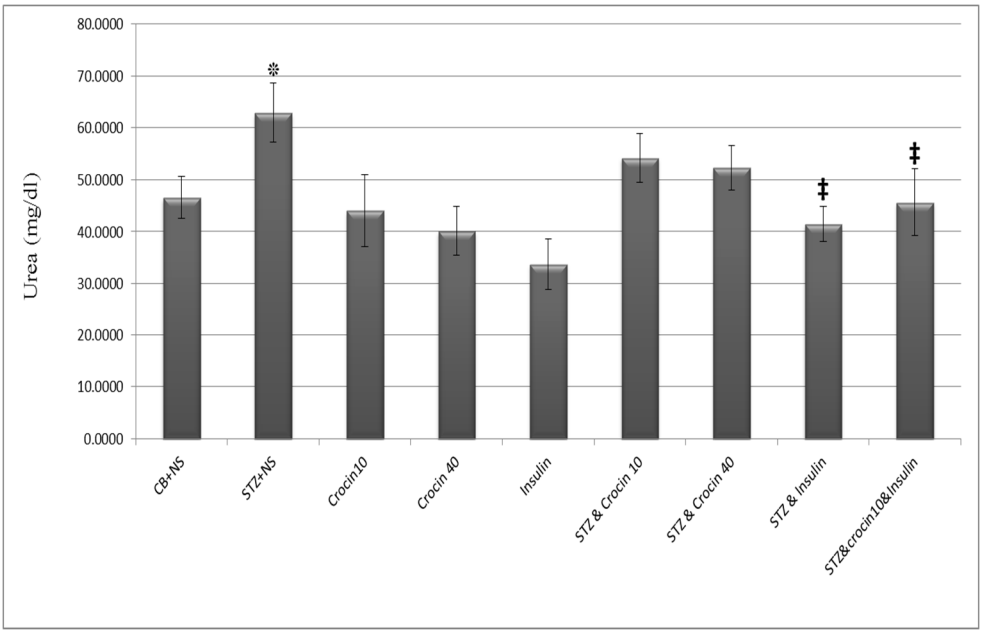
*: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده CB + NS می‌باشد.

†: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده STZ + NS می‌باشد.

CB:Citrate Buffer:(بافر سیترات)،STZ:Streptozotocin: (استرپتوزوتوسین)،NS:Normal Saline: (سالین نرمال)

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی STZ درمقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان اوره گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان اوره سرم ایجاد نکرد. تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر mg/kg ۱۰ و ۴۰ از افزایش میزان اوره سرم ۲۰ روز پس از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌داری جلوگیری نکرد. تزریق به تنهایی انسولین (۵ واحد بر کیلوگرم) و تزریق توأم کروسین (mg/kg ۱۰) و انسولین از افزایش میزان اورۀ سرم ناشی از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌دار جلوگیری کرد (نمودار ۴).



نمودار (۴): اثر تزریقات کروسین و انسولین بر میزان اورۀ خون در رت‌های سالم و دیابتی در روز ۲۰. داده‌ها در نمودار به صورت Mean ± SEM آورده شده‌اند.

*: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده CB + NS می‌باشد.

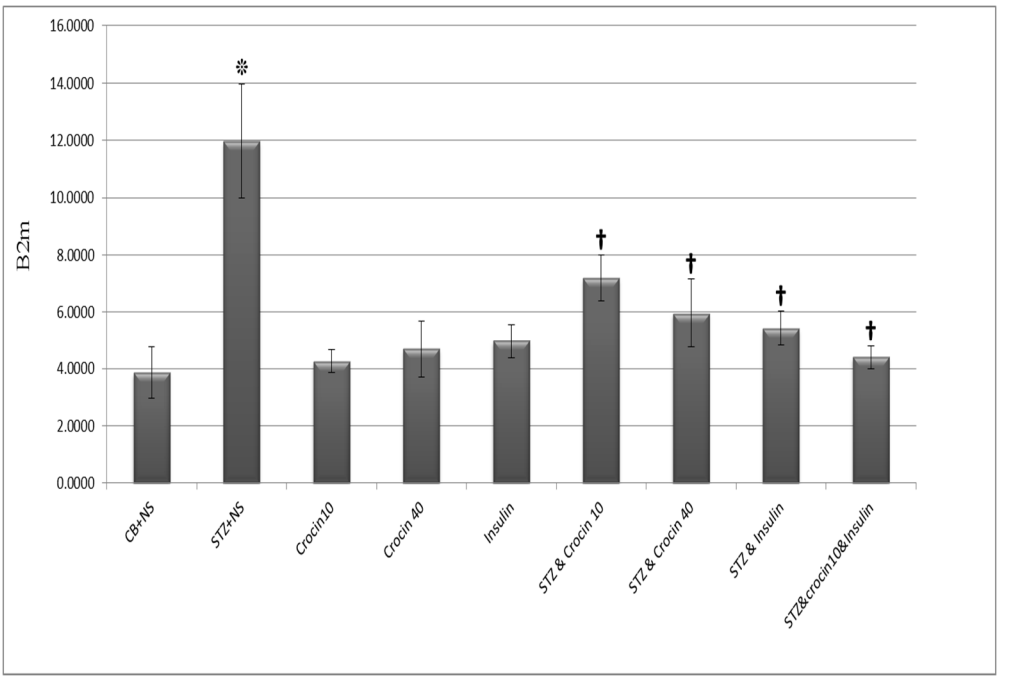
‡: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده STZ + NS می‌باشد.

CB:Citrate Buffer:(بافر سیترات)،STZ:Streptozotocin: (استرپتوزوتوسین)،NS:Normal Saline: (سالین نرمال)

تزریق داخل صفاقی STZ درمقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان β2M گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان β2M نداد. تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر mg/kg ۱۰ و ۴۰ و تزریق زیرجلدی انسولین در مقدار ۵ واحد به ازای یک کیلوگرم از افزایش میزان β2M سرم ناشی از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌داری جلوگیری کرد.

تزریق توأم داخل صفاقی کروسین (mg/kg۱۰) و زیر جلدی انسولین (۵ واحد به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) یک اثر جلوگیری کننده معنی‌دار در مقابل افزایش β2M سرم (۲۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین) ایجاد کرد (نمودار ۵).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018



نمودار (۵): اثر تزریقات کروسین و انسولین بر میزان β2M خون در رت‌های سالم و دیابتی در روز ۲۰. داده‌ها در نمودار به صورت Mean ± SEM آورده شده‌اند.

*: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده CB + NS می‌باشد.

†: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده STZ + NS می‌باشد.

CB:Citrate Buffer:(بافر سیترات)،STZ:Streptozotocin: (استرپتوزوتوسین)،NS:Normal Saline: (سالین نرمال)

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین درمقدار ۴۲mg/kg سبب افزایش گلوکز خون به (۳۰±۴۹۰/۲) میلی‌گرم در دسی لیتر شد. این میزان قند خون نشان‌دهنده دیابتی شدن حیوانات می‌باشد (۱۹). در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان گلوکز خون نداد. این یافته با نتایج مطالعه Ali Arasteh و همکاران که دریافتند عصاره سافرون به‌طور معنی‌داری باعث کاهش گلوکز در رت‌های سالم می‌شود؛ تناقض دارد (۲۰). همین‌طور Kianbakht &Hajiaghaee (۲۰۱۱) تأثیرات معنی‌دار و کاهندهٔ عصاره زعفران و کروسین بر مقادیر گلوکز خون را متعاقب ۶ هفته گزارش نموده‌اند (۱۴). در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت‌های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان گلوکز وانسولین خون نداد. از آنجاییکه سطح سرمی انسولین در گروه دریافت‌کننده STZ + Crocin 10 mg/kg و حتی گروه STZ + Crocin 40 mg/kg هنوز به‌طور معنی‌داری پایینتر از گروه CB + NS می‌باشد، بنابراین نقش مهاری کروسین روی افزایش گلوکز، احتمالاً از طریق افزایش حساسیت به انسولین صورت گرفته است. موید این نظر این است که: ۱) تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۱۰ mg/kg و ۴۰ مانع از افزایش میزان گلوکز خون ناشی از تزریق داخل صفاقی STZ در روز ۲۰ پس از تزریق STZ شد. حتی اثر کاهش‌دهنده گلوکز خون ناشی ازکروسین ۴۰ mg/kg در روز ۲۰ به‌طور معنی‌دار بیشتر از کروسین 10 mg/kg بود. ۲) تزریق زیر جلدی انسولین در مقدار ۵ واحد به ازای یک کیلوگرم به‌طور معنی‌داری موجب جلوگیری از افزایش میزان گلوکز خون ناشی از STZ در روز ۲۰ پس از تزریق STZ شد. از طرف دیگر تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۱۰ mg/kg و ۴۰ از کاهش میزان انسولین سرم ناشی از تزریق داخل صفاقی STZ در روز ۲۰ پس از تزریق STZ به‌طور معنی‌داری جلوگیری نموده است، و از آنجاییکه سطح سرمی انسولین در گروه دریافت‌کننده STZ + Crocin 10 mg/kg و حتی گروه STZ + Crocin 40 mg/kg هنوز به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه STZ + NS می‌باشد، می‌توان گفت در رت‌های دیابتی کروسین می‌تواند از طریق تحریک ترشح انسولین نیز مانع از کاهش معنی‌دار میزان انسولین سرم گردد. بنابراین می‌توان به‌طور کلی نتیجه‌گیری نمود در تغییرات ایجادشده به دنبال تزریق داخل صفاقی کروسین در رت‌های دیابتی، هم افزایش حساسیت به انسولین و هم تحریک ترشح انسولین به‌طور

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

توام نقش دارند. نکته بسیار جالب این است که به نظر می رسداین نقش افزایش حساسیت به انسولین و تحریک ترشح انسولین بسیار هوشمند بوده و در رت‌های غیر دیابتی که میزان گلوکز و انسولین آنها در محدوده طبیعی قرار دارد اعمال نمی‌گردد. از نتایج مطالعه حاضر برمی‌آید تغییرات ناشی از مصرف کروسین در رت‌های سالم و دیابتی در حضور دوز پایین کروسین (10 mg/kg) به‌صورت معنی‌دار بروز پیدا نمی‌کند ولی در حضور دوز بالای کروسین (40 mg/kg) تغییرات معنی‌دار آشکار می‌گردد. گلوکز پلاسمایی افزایش یافته در رت‌های دیابتی، با تزریق کروسین پایین آمد که افزایش سطح انسولین را نسبت به رت‌های سالم نشان داد. از این نظر عمل انسولین شبیه Glibenclamide بود (۲۱). این یافته‌ها با نتایج Mohajeri و همکاران (2009) که نشان دادند تجویز عصاره زعفران در رت‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری باعث افزایش انسولین پلاسما و کاهش گلوکز آن می‌شود؛ هم‌خوانی دارد (۲۲). بنابر یافته‌های محققین اثر هایپوگلیسمیک عصاره زعفران می‌تواند با مکانیسم‌هایی نظیر کاهش مقاومت به انسولین (۱۷)، تحریک جذب گلوکز به وسیله بافت‌های محیطی (۲۳)، و ممانعت از جذب گلوکز روده‌ای (۲۴) اعمال گردد. به نظر می‌رسد که اثر هایپوگلیسمیک گیاهان دارویی دیگر و زعفران مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاهان است (۲۵, ۲۶). در مطالعه‌ای دیگر به دنبال تجویز داخل صفاقی کروسین با دزهای ۲۰mg/kg و ۶۰ اثرات هاپوگلیسمیک و آنتی‌اکسیدانتی کروسین گزارش شده است (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر کروسین سبب افزایش مالوندی آلدیید و گزانتین اکسیداز و کاهش صدمات بافتی در رت‌های دیابتی شده است (۱۵). در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین درمقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان اوره و کراتینین گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان اوره و کراتینین سرم ایجاد نکرد. تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۴۰ mg/kg و ۱۰ از افزایش میزان اوره و کراتینین سرم ۲۰ روز پس از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌داری جلوگیری نکرد. مطابق با مطالعه حاضرعدم تغییر سطح پلاسمایی کراتینین متعاقب تجویز خوراکی کروسین با دز ۱۵۰ mg/kg و ۵۰ به مدت ۶ هفته در رت‌های دیابتی در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است (۱۴). چنانکه ذکر شد در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی کروسین، ۲۰ روز پس از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین در مقادیر ۱۰ mg/kg و ۴۰ به‌طور معنی‌داری از افزایش میزان β2M جلوگیری کرد و در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان β2M نداد. یکی از نکات بسیار مهم در بیماری دیابت تشخیص به‌موقع این بیماری و جلوگیری از پیشرفت عوارض خطرناک آن نظیر نفروپاتی می‌باشد، بطوریکه پیش آگهی بیماری می‌تواند با تشخیص و درمان به‌موقع خوب باشد (۲۸). اهمیت β2M در تشخیص زود هنگام بیماری کلیوی در مطالعات قبلی ثابت شده است و مطرح گردیده که هر چند حضور میکروآلبومینوریا به‌عنوان یک شاخص زود هنگام برای تشخیص درگیری گلومرول‌ها در نفروپاتی کلیوی مطرح می‌باشد، ولی شواهدی وجود دارد β2M حتی زودتر از میکروآلبومینوریا افزایش می‌یابند (۲۹). مشخص گردیده که مقادیر سرمی β2M قبل از اوره و کراتینین افزایش می‌یابد (۷). یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج مطالعات فوق الذکر مطابقت دارد. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تجویز کروسین ۲۰ روز پس از تزریق داخل صفاقی STZ هم در دز ۱۰ mg/kg و هم در دز ۴۰mg/kg از افزایش معنی‌دار مقادیر سرمی اوره و کراتینین در رت‌های دیابتی جلوگیری ننموده، ولی از افزایش معنی‌دار مقادیر سرمی β2M جلوگیری کرده است. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که برای جلوگیری از پیشرفت آسیبهای کلیوی زمان ۲۰ روز برای تجویز داخل صفاقی کروسین در مقادیر mg/kg ۱۰ و ۴۰، کافی نمی‌باشد، چراکه مقادیر سرمی اوره و کراتینین به‌طور معنی‌داری کاهش نداشته است. بنابراین نتایج مطالعه حاضر ضمن اینکه بر اهمیت β2M در کنار اوره و کراتینین برای تشخیص نفروپاتی کلیوی صحه می‌گذارد، نشان می‌دهد که کروسین می‌تواند به‌عنوان یک عامل جلوگیری کننده از نفروپاتی کلیوی مطرح گردد. در پایان با توجه به روند مزمن بروز ضایعات کلیوی انجام مطالعه در زمان طولانی ترو نیز انجام مطالعات زمان بندی شده برای شناسایی زمان دقیقتر شروع عوارض کلیوی به‌منظور شروع هر چه سریعتر درمان قبل از تغییرات غیر قابل برگشت کلیه پیشنهاد می‌گردد.

References:

1. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med 2002;346:1145-51.
2. Mihai B, Lăcătuşu C, Graur M. Specific elements of diagnosis in diabetic nephropathy. Rev med chir soc med nat iasi 2007;111:329-37.
3. Rabkin R. Diabetic nephropathy. Clin Cornerstone 2003;5:1-11.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

4. Ayepola OR, Cerf ME, Brooks NL, Oguntibeju OO. Kolaviron, A biflavonoid complex of Garcinia kola seeds modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in diabetes-induced nephrotoxic rats. Phytomedicine 2014;15:1785-93.
5. Rashki Kemmak M, Gol A, Dabiri S, Javadi AR. Preventive and Therapeutic Role of Garlic (Allium Sativum) on Renal Complications in Rats with Diabetes Mellitus. Iran J Biol 2011;24:694-706.
6. Fettman MJ. Comparison of urinary protein concentration and protein creatinine ratio vs routin microscopy in urinalysis of dogs: 500 cases. J am vet med Assoc 1987;195:972-89.
7. Javadi S, Asri-Rezaei S, Allahverdizadeh M . Interrelationship of βeta-2 microglobulin, blood urea nitrogen and creatinine in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rabbits. Veterinary Res Forum 2014;5:7-11.
8. Bellotti V, Mangione P, Stoppini M. Biological activity and pathological implications of misfolded proteins. Cell mol life Sci 1999;55:977-91.
9. Zhang H, Liew CC, Marshall KW. Microarray analysis reveals the involvement of beta-2 microglobulin (B2M) in human osteoarthritis. Osteoarthr Cartil 2002;10(12):950–60.
10. Tamilson PA. Low molecular weight proteins in children with renal disease. Pediatric Nephrol 1992;6:565-571.
11. Wilson AM, Kimura E, Harada RK, Nair N, Narasimhan B, Meng XY, et al. Beta2-microglobulin as a biomarker in peripheral arterial disease: proteomic profiling and clinical studies. Circulation 2007;18:1396-403.
12. Michelis R, Sela S, Ben-Zvi I, Nagler RM. Salivary beta2-microglobulin analysis in chronic kidney disease and hemodialysis patients. Blood Purify 2007;25:505-9.
13. Quesada JM, Alonso J, Gonzalez J, Muñoz R, Jans I, Martiu A, et al. Serum beta-2 microglobulin is a marker of high bone remodelling in elderly women. Mech Ageing Dev 1998; 102(2-3):293-8.
14. Kianbakht S, Hajiaghaee R. Anti-hyperglycemic effects of saffron and its Active constituents, Crocin and safranal, in alloxan-induced diabetic rats. J Med Plants 2011;10:39-45.
15. Altinoz E, Oner Z, Elbe H, Cigremis Y, Turkoz Y. Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Hum Exp Toxicol 2015;34 (2):127-34.
16. Loskutov AV, Beninger CW, Hosfield GL, Sink KC. Development of an improved procedure for extraction and quantitation of safranal in stigmas of Crocus sativus L. using high performance liquid chromatography. Food chem 2000;69:87-95.
17. Xi L, Qian Z, Du P, Fu J. Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. Phytomedicine 2007;14(9):633–6.
18. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (Crocus sativus L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. J pharm Pharmaceut 2005;8:387-93.
19. Martinez-Tellez R, Gomez-Villalobos MJ, Flores G .Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by Streptozotocine. Brain Res 2005;1048:108-15.
20. Arasteh A, Aliyev A, Khamnei S, Delazar A, Mesgari M, Mehmannavaz Y. Effects of hydromethanolic extract of saffron (Crocus sativus) on serum glucose, insulin and cholesterol levels in healthy male rats. J Med Plant Res 2010;4:397-402.
21. Tian YA, Johnson G, Ashcroft SJ. Sulfonylureas enhance exocytosis from pancreatic beta-cells by a mechanism that does not involve direct activation of protein kinase C. Diabetes 1998;47:1722-6.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

22. Mohajeri D, Mousavi GH, Doustar Y. Anti-hyperglycemic and pancreases-protective effects of Crocus sativus L. (saffron) stigma ethano J. cardivasc. Pharmacol lic extract on rat with alloxan-induced diabetes. J biol sci 2009;9:302-10.
23. Yang YC, Hsu HK, Hwang JH, Hong SJ. Enhancement of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by Toona sinensis leaf extract. J Med Sci 2003;19:327-33.
24. Youn JY, Park HY, Cho KH. Anti-hyperglycemic activity of Commelina communis L. inhibition of a-glycosidase. Diabetes Res Clin Pract 2004;66:S149-S55.
25. Sadat Heidary S, Bahmani F, Bathaei Z, Moshtaghi Kashanian Gh. Assessment of Myo inositol and crocin effects on RAGE and TGFβ gene expression in the kidney of Streptozotocin induced diabetic rats. J Hamadan Univ Med Sci 2014;21:293-8.
26. Al-Azzawie HF, Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. Life Sci 2006;78:1371-7.
27. Rajaei Z, Hadjzadeh MA, Nemati H, Hosseini M, Ahmadi M, Shafiee S. Antihyperglycemic and antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. J Med Food 2013;16: 206-10.
28. Sämann A, Wolf G. Diabetic nephropathy. Internist 2012;53(10):1195-206.
29. Hong CY, Chia KS. Markers of diabetic nephropathy. J Diabetes Complicat 1998;12(1):43–60.

Original Article

EVALUATION OF THE EFFECTS OF CROCIN ON THE SERUM LEVELS OF GLUCOSE, INSULIN, UREA, CREATININE AND B2M IN HEALTHY AND STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Hamed Samadi[1], Shahrm Javadi[2], Siamak Asri[3]*

Received: 23 Aug , 2015; Accepted: 25 Oct , 2015

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 14:18 +0430 on Wednesday August 15th 2018

Abstract

Background & Aims: In order to evaluate the alleviative effect of crocin on diabetes mellitus and its kidney complications, the serum levels of glucose, insulin, urea, creatinine and β2M were examined in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats after crocin administration.

Materials & Methods: In this study 45 rats were divided into 9 groups (5 each) of healthy control, diabetic control, diabetic treatment with crocin (two dose of 10 and 40 mg/kg) and diabetic positive treatment (with insulin 5 mg/kg) in a period of 20 days.

Results: The results indicated that the serum levels β2M, urea and creatinine significantly increased in diabetic rats. However, in groups receiving crocin with the dose of 10 and 40 mg/kg the serum levels of β2M were significantly lower than the control diabetic rats showing beneficial effect of crocin preventing diabetic nephropathy. Although the serum levels of urea and creatinine decreased in crocin receiving groups but they did not reach to a significant level.

***Conclusion*:** Finally, crocin decreased the serum levels of β2M, glucose, urea and creatinine in diabetes mellitus causing a protective effect on the disease and its kidney complications. It seems the beneficial effect of crocin was modulating with stimulatory insulin secretion and ameliorative insulin resistance effects.

***Keywords*:** Diabetes Mellitus, Streptozotocin, Crocin, Insuline, beta-2 microglobulin

Address: Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Tel: +98 4432771926

Email: S.Javadi@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2015: 26(9): 812 ISSN: 1027-3727

[1] *DVM, Urmia University, Urmia, Iran*

[2] *Associate Professor, Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*

[3] *Associate Professor, Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*