

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 و بتا دو میکروگلوبولین ($\beta 2M$) در رت‌های سالم و دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (42 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 مقدار 40 mg/kg و 10)، 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 $\beta 2M$ ، اوره، کراتینین و گلوکز در گروه کنترل دیابتی در قیاس با گروه کنترل سالم بود. مقادیر $\beta 2M$ و گلوکز گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده کروسین ($10, 40 \text{ mg/kg}$) 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 $\beta 2M$ ، گلوکز، اوره و کراتینین را در رت‌های دیابتی کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد اثرات سودمند کروسین روی سطوح سرمی $\beta 2M$ 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 گломروولی در دیابت ملیتوس طی طولانی‌مدت ایجاد شده و به ناتوانی و مرگ‌ومیر بیماران دیابتی منجر می‌شود (۱). 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 توبول‌پرگزیمال و آنروپی 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 ($\beta 2M$) یک متابولیت برای ارزیابی فعالیت کلیه‌هاست، چراکه ۹۷ درصد این پروتئین توسط گلومرول‌ها فیلتر می‌شود (۸) و مقادیر

^۱ دانش آموخته دکتری 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

طبیعی آن در سرم انسان کم‌تر از 0.2 mg/dl 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 $\beta 2M$ در تشخیص زودهنگام بیماری کلیوی در مطالعات قبلی ثابت شده است و مشخص گردیده که مقادیر سرمی $\beta 2M$ قبل از اوره و کراتینین افزایش می‌یابد (۷). در بیماری کلیوی نوزادان افزایش دفع ادراری $\beta 2M$ به‌عنوان یک شاخص درگیری توبولار شناخته شده است (۱۰). در مطالعه‌ای نقش $\beta 2M$ به‌عنوان یک شاخص بیولوژیکی در بیماری شریان‌های محیطی به اثبات رسیده است (۱۱) در مطالعه‌ای دیگر میزان $\beta 2M$ موجود در بزاق بیماران مبتلا به نارسایی مزمن کلیوی سنجیده شده و نتیجه‌گیری شده که میزان $\beta 2M$ موجود در بزاق می‌تواند به‌عنوان یک روش قابل‌اطمینان برای ارزیابی سطح $\beta 2M$ خون جهت پیش‌بینی نارسایی مزمن کلیوی ناشی از آمیلوئیدوز قلمداد گردد (۱۲) از طرفی مشخص شده $\beta 2M$ می‌تواند به‌عنوان هورمون رشد استخوانی در تنظیم فعالیت سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست استخوانی ایفای نقش نماید و می‌تواند به‌عنوان شاخصی بیولوژیکی در متابولیسم 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 مشخص شده 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 $280-350$ گرم به مدت ۳ هفته جهت تطابق با محیط آزمایشگاه نگهداری شدند. حیوانات در ۹ گروه پنج‌تایی با درجه حرارت $23-20$ 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 از جمله نرمال سالین و بافر سیترات با $(\text{PH}=4.5)$ مورد استفاده قرار گرفت. پودر کروسین با نرمال سالین و پودر استرپتوزوتوسین (STZ) در بافر سیترات با $(\text{PH}=4.5)$ 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

گروه‌ها	تزریقات
۱	تزریق داخل صفاقی نرمال سالین و بافر سیترات $(\text{PH}=4.5)$ _ گروه کنترل
۲	تزریق داخل صفاقی STZ با دوز 42 mg/kg محلول در بافر سیترات $(\text{PH}=4.5)$
۳	تزریق داخل صفاقی کروسین با دوز 10 mg/kg محلول در نرمال سالین
۴	تزریق داخل صفاقی کروسین با دوز 40 mg/kg 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 و کروسین 10 mg/kg
۷	تزریق داخل صفاقی STZ برای ایجاد دیابت و کروسین 40 mg/kg
۸	تزریق داخل صفاقی STZ برای ایجاد دیابت و تزریق زیر جلدی انسولین ۵ واحد بر kg وزن بدن
۹	تزریق داخل صفاقی STZ برای ایجاد دیابت و کروسین (10 mg/kg) + تزریق زیر جلدی انسولین

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 4.5 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 اندازه گیری شد. مقادیر گلوکز خون بالای 250 mg/dl به عنوان حیوان دیابتی در نظر گرفته شد. در غیر اینصورت حیوان دیگری جایگزین گردید.

روش خون گیری برای اندازه گیری گلوکز خون:

برای بررسی میزان گلوکز، در روز سوم پس از تزریق داخل صفاقی STZ خون گیری از دم انجام شد. برای اینکار هر 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 قرارداد شد، میزان گلوکز خون از روی دستگاه قرائت شد. روش خون گیری برای تهیه سرم:

برای خون گیری 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 در همان روز سانتریفیوژ گشته (۳۵۰۰ دور به مدت 15 دقیقه) و سرم جداسازی شد.

نمونه های سرم تهیه شده در دمای ۷۰-، تا زمان شروع اندازه گیری گلوکز و انسولین، بتا-۲-میکروگلوبولین، اوره و کره آنتینن فریز گردیدند. مقادیر گلوکز به عنوان یک اندیکاتور برای ارزیابی هیپرگلیسمی مورد سنجش قرار گرفت که مقادیر گلوکز بالای ۲۵۰ mg/dl به صورت پایدار و مقادیر پایین انسولین در مقادیر نزدیک به صفر و غیر قابل اندازه گیری، مؤید ایجاد دیابت ملیتوس تیپ ۱ می باشد.

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 درمان های توأم، کروسین ۱۰ mg/kg و انسولین ۵ واحد به صورت هم زمان و یکروز در میان تزریق گردید.

اندازه گیری 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 β_2M ، ساخت شرکت Biotech آمریکا استفاده شد. هم زمان با انجام آزمایش بر روی نمونه ها، ست استاندارد برای کالیبره کردن نیز آزمایش گردید.

اندازه گیری اوره سرم:

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

اندازه گیری کراتینین:

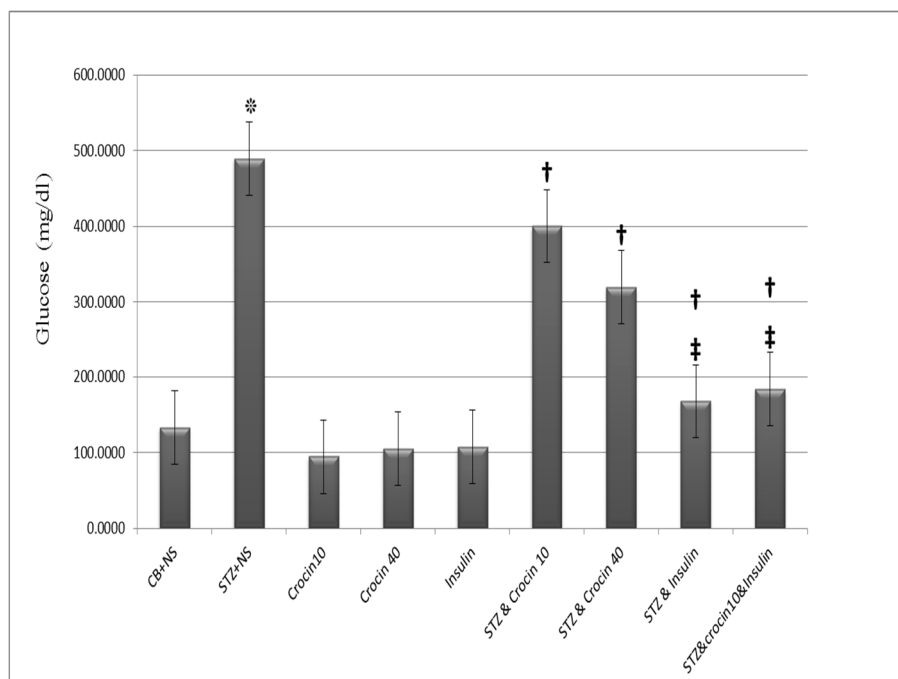
سنجش کراتینین با استفاده از کیت کراتینین ساخت شرکت پارس آزمون (به روش دستی) و دستگاه اسپکتوفتومتر Pharmacia انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده ها:

آزمون آماری با استفاده از برنامه آماری SPSS نسخه ۱۵ بررسی گردید. داده ها به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار بیان گردیدند. آنالیز واریانس یکطرفه و سپس پس آزمون Tukey جهت بررسی آماری استفاده گردید. مقادیر $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

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



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 $\pm$ 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.

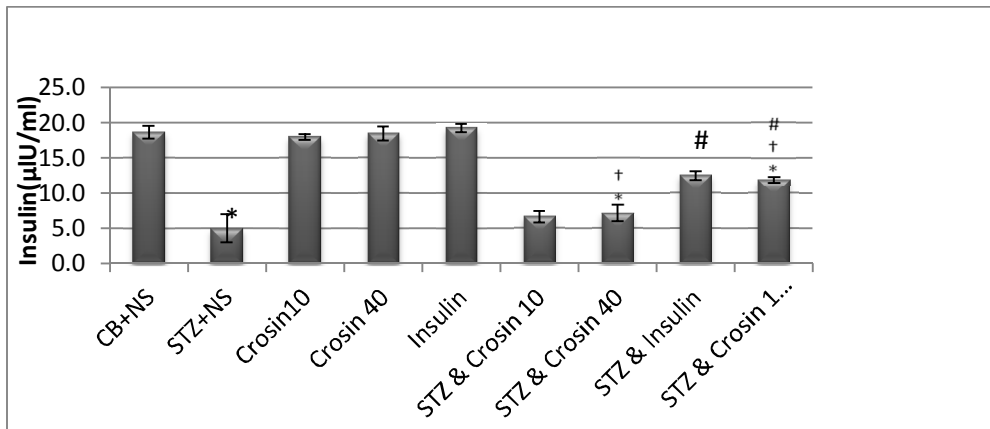
CB: Citrate Buffer (بافر سیترات)، STZ: Streptozotocin (استرپتوزوتوسین)، NS: Normal Saline (سالین نرمال)

جلوگیری کرد. تزریق زیر جلدی انسولین در مقدار ۵ واحد به ازای یک کیلوگرم به‌طور معنی‌دار ($p < 0.05$) موجب جلوگیری از کاهش میزان انسولین سرم ناشی از استرپتوزوتوسین در روز ۲۰ پس از تزریق استرپتوزوتوسین شد. اثر انسولین به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) 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 جلوگیری‌کننده غیر معنی‌دار نسبت به انسولین به تنهایی و معنی‌دار ($p < 0.05$) نسبت به کروسین به تنهایی و نسبت به استرپتوزوتوسین در روز ۲۰ پس از تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد کرد (نمودار ۲).

میزان انسولین خون پس از تزریق داخل صفاقی بافر سیترات و به دنبال آن تزریق داخل صفاقی سالین نرمال در روز ۲۰، $26 \pm 18/7$ میکروواحد در یک میلی‌لیتر سرم خون به دست آمد. تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین موجب کاهش میزان انسولین سرم در روز ۲۰ به $5/04 \pm 0/35$ 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 ($p < 0.05$)



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 $\pm$ SEM آورده شده‌اند. #: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ($p < 0.05$) با گروه دریافت‌کننده CB + NS می‌باشد. †: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ($p < 0.05$) با گروه دریافت‌کننده STZ + NS می‌باشد. #: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ($p < 0.05$) 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.

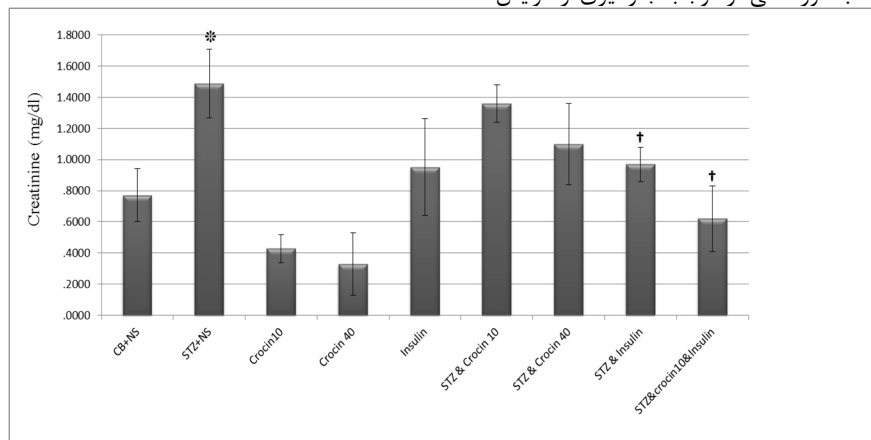
CB: Citrate Buffer (بافر سیترات) STZ: Streptozotocin (استرپتوزوتوسین)

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

SC: Subcutaneous (زیر جلدی)

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).

در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی STZ در مقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان کراتینین گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت‌های 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



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 $\pm$ SEM آورده شده‌اند.

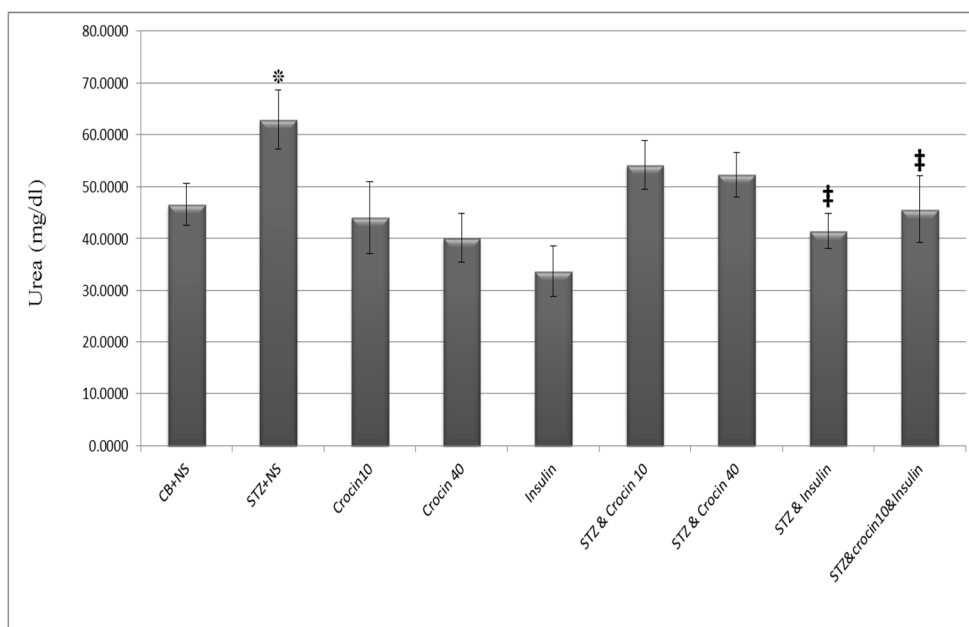
*: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده CB + NS می‌باشد.

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

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

داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌داری جلوگیری نکرد. تزریق به تنهایی انسولین (۵ واحد بر کیلوگرم) و تزریق توأم کروسین (۱۰ mg/kg) و انسولین از افزایش میزان اوره سرم ناشی از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌دار جلوگیری کرد (نمودار ۴).

در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی STZ درمقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان اوره گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت‌های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان اوره سرم ایجاد نکرد. تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۱۰ و ۴۰ از افزایش میزان اوره سرم ۲۰ روز پس از تزریق



نمودار (۴): اثر تزریقات کروسین و انسولین بر میزان اوره خون در رت‌های سالم و دیابتی در روز ۲۰. داده‌ها در نمودار به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ آورده شده‌اند.

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

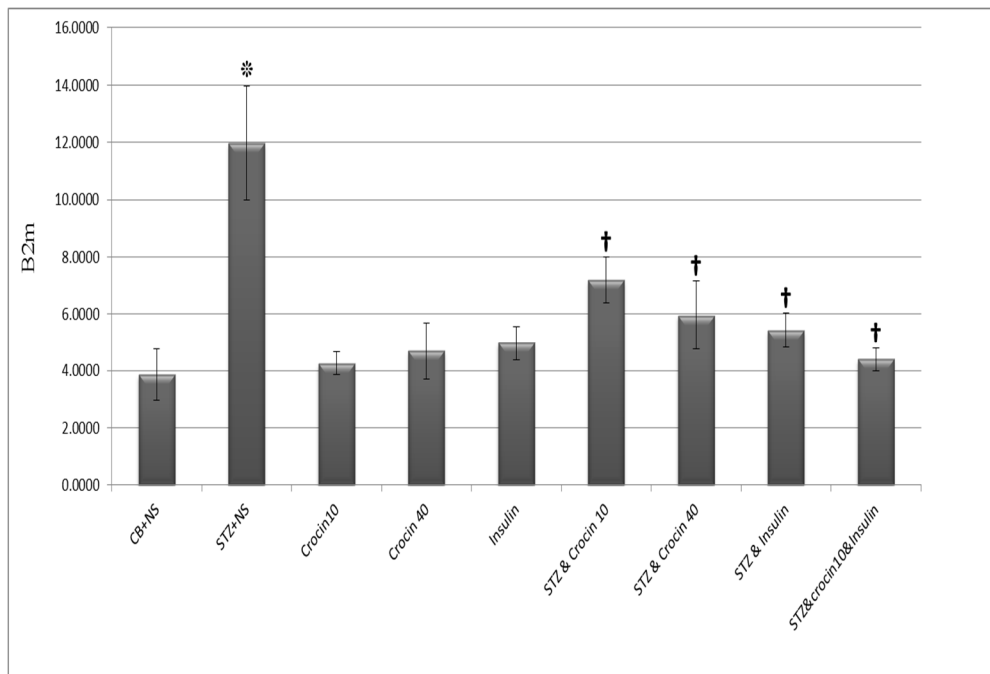
‡: نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه دریافت‌کننده STZ + NS می‌باشد.

CB: Citrate Buffer; STZ: Streptozotocin; (استرپتوزوتوسین); NS: Normal Saline; (سالین نرمال)

کیلوگرم از افزایش میزان $\beta 2M$ سرم ناشی از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌داری جلوگیری کرد.

تزریق توأم داخل صفاقی کروسین (۱۰ mg/kg) و زیر جلدی انسولین (۵ واحد به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) یک اثر جلوگیری کننده معنی‌دار در مقابل افزایش $\beta 2M$ سرم (۲۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین) ایجاد کرد (نمودار ۵).

تزریق داخل صفاقی STZ درمقدار ۴۲mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان $\beta 2M$ گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت‌های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان $\beta 2M$ نداد. تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۱۰ و ۴۰ و تزریق زیرجلدی انسولین در مقدار ۵ واحد به ازای یک



نمودار (۵): اثر تزریقات کروسین و انسولین بر میزان $\beta 2M$ خون در رت‌های سالم و دیابتی در روز ۲۰. داده‌ها در نمودار به صورت Mean $\pm$ 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 در مقدار 42 mg/kg سبب افزایش گلوکز خون به (490 ± 30) میلی‌گرم در دسی لیتر شد. این میزان قند خون نشان‌دهنده دیابتی شدن حیوانات می‌باشد (۱۹). در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت‌های 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 & Hajiaghache (۲۰۱۱) تأثیرات معنی‌دار و کاهنده 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 و انسولین 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 10 mg/kg و 40 mg/kg 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 از کروسین 40 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 10 mg/kg و 40 mg/kg 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

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 و ۴۰ mg/kg به‌طور معنی‌داری از افزایش میزان $\beta 2M$ جلوگیری کرد و در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت‌های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان $\beta 2M$ نداد. یکی از نکات بسیار مهم در بیماری دیابت تشخیص به‌موقع این بیماری و جلوگیری از پیشرفت عوارض خطرناک آن نظیر نفروپاتی می‌باشد، بطوریکه پیش‌آگهی بیماری می‌تواند با تشخیص و درمان به‌موقع خوب باشد (۲۸). اهمیت $\beta 2M$ 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 گلوبول‌ها در نفروپاتی کلیوی مطرح می‌باشد، ولی شواهدی وجود دارد $\beta 2M$ حتی زودتر از میکروآلبومینوریا افزایش می‌یابد (۲۹). مشخص گردیده که مقادیر سرمی $\beta 2M$ قبل از اوره و کراتینین افزایش می‌یابد (۷). یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج مطالعات فوق‌الذکر مطابقت دارد. با توجه به اینکه در مطالعه حاضر تجویز کروسین ۲۰ روز پس از تزریق داخل صفاقی STZ هم در دز ۱۰ و ۴۰ mg/kg و هم در دز ۴۰ mg/kg از افزایش معنی‌دار مقادیر سرمی اوره و کراتینین در رت‌های دیابتی جلوگیری ننموده، ولی از افزایش معنی‌دار مقادیر سرمی $\beta 2M$ 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 $\beta 2M$ در کنار اوره و کراتینین برای تشخیص نفروپاتی کلیوی صحت 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 طولانی‌تر و 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.

توام نقش دارند. نکته بسیار جالب این است که به نظر می‌رسد این 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 پلازما 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 ۲۰ و ۶۰ mg/kg اثرات هایپوگلیسمیک و آنتی‌اکسیدانی کروسین گزارش شده است (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر کروسین سبب افزایش مالوندی آلدید و گزانتین اکسیداز و کاهش صدمات بافتی در رت‌های دیابتی شده است (۱۵). در مطالعه حاضر تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین درمقدار ۴۲ mg/kg به‌طور معنی‌داری سبب افزایش میزان اوره و کراتینین گردید. در غیاب استرپتوزوتوسین (در رت‌های سالم)، کروسین تغییر معنی‌داری در میزان اوره و کراتینین سرم ایجاد نکرد. تزریق داخل صفاقی کروسین در مقادیر ۴۰ و ۱۰ mg/kg از افزایش میزان اوره و کراتینین سرم ۲۰ روز پس از تزریق داخل صفاقی STZ به‌طور معنی‌داری جلوگیری نکرد. مطابق با مطالعه حاضر عدم تغییر سطح پلاسمایی کراتینین متعاقب تجویز خوراکی کروسین با دز ۱۵۰ و ۵۰

References:

1. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. N Engl J Med 2002;346:1145-51.
2. Mihai B, Lăcătușu 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.

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 routine 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 β -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 β -2 microglobulin (B2M) in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(12):950-60.
10. Tamilselvan 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. β -2-microglobulin as a biomarker in peripheral arterial disease: proteomic profiling and clinical studies. *Circulation* 2007;115:1396-403.
12. Michelis R, Sela S, Ben-Zvi I, Nagler RM. Salivary β -2-microglobulin analysis in chronic kidney disease and hemodialysis patients. *Blood Purification* 2007;25:505-9.
13. Quesada JM, Alonso J, Gonzalez J, Muñoz R, Jans I, Martiu A, et al. Serum β -2 microglobulin is a marker of high bone remodelling in elderly women. *Mech Ageing Dev* 1998; 102(2-3):293-8.
14. Kianbakht S, Hajiaghache 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 (crocin 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, Mehmannaavaz 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 β -cells by a mechanism that does not involve direct activation of protein kinase C. *Diabetes* 1998;47:1722-6.

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 α -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 TGF β 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.

EVALUATION OF THE EFFECTS OF CROCIN ON THE SERUM LEVELS OF GLUCOSE, INSULIN, UREA, CREATININE AND β 2M IN HEALTHY AND STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS

Hamed Samadi¹, Shahrm Javadi^{2*}, Siamak Asri³

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

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 β 2M 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 β 2M, 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 β 2M 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 β 2M, 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