

اثرات مصرف عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو بر نفروپاتی دیابتی در موش صحرایی

زهرا قیروانی¹، محمود زردست²، محمد حسن پور فرد³، مهران حسینی⁴

چکیده

زمینه و هدف: همزمان با افزایش اقبال عموم به مصرف گیاهان دارویی، انجام تحقیقات علمی به منظور ارزیابی کارایی و اثرات سوء احتمالی این ترکیبات، ضرورت پیدا کرده است. در مطالعات اخیر، تیغه میانی گردو به عنوان ترکیبی با خواص کاهنده قند خون معرفی شده است؛ بنابراین پژوهش حاضر به منظور ارزیابی اثرات مصرف آن بر عملکرد بیوشیمیایی و تغییرات پاتولوژیک بافت کلیه در موش های صحرایی دیابتی طراحی و اجرا گردید.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی 32 موش صحرایی نر نژاد ویستار مبتلا به دیابت حاد (القا شده توسط آلوکسان) و 8 سر موش سالم، به پنج گروه مساوی (4 گروه دیابتیک و یک گروه سالم) تقسیم شدند. گروه های I و II دیابتیک به ترتیب: با غلظت های 400 و 200mg/kg عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو، گروه III دیابتیک با داروی متفورمین (50mg/kg) و گروه های IV دیابتیک و کنترل سالم با نرمال سالین، روزانه به مدت 4 هفته به صورت خوراکی تیمار شدند. در پایان، اندازه گیری پارامترهای بیوشیمیایی شامل: قند خون، پروتئین ادرار 24 ساعته، کراتینین و نیتروژن اوره خون و همچنین تغییرات کمی و کیفی آسیب شناسی کلیه (1200 گلومرول) در تمام گروه ها انجام گرفت و مقادیر آنها در بین گروه ها مقایسه گردید.

یافته ها: عصاره تیغه میانی گردو، در اثری غیر وابسته به دوز، مقادیر قند خون، پروتئین ادرار، کراتینین و نیتروژن اوره خون و شاخص های کمی پاتولوژیک مانند: اندازه گلومرول، چسبندگی کلافه گلومرولی به کپسول بومن و انتشار ماتریکس مزانشیال را در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک کاهش داد ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: مصرف تیغه میانی گردو، می تواند اثرات سودمندی بر عملکرد کلیوی رت های دیابتیک داشته باشد.

واژه های کلیدی: نفروپاتی دیابتی؛ گیاهان دارویی؛ تیغه میانی گردو؛ رت

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، 1394؛ 22 (2): 104-114.

پذیرش: 1394/06/07

دریافت: 1394/03/22

¹ مربی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران؛

² استادیار، گروه پاتولوژی، بیمارستان ولی عصر (عج)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران؛

³ استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران؛

⁴ نویسنده مسؤول: کارشناس بهداشت عمومی، مرکز تحقیقات طب تجربی، معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران.

آدرس: استان خراسان جنوبی - بیرجند - خیابان غفاری - دانشگاه علوم پزشکی بیرجند - مرکز تحقیقات طب تجربی.

تلفن: +985632395168 نمابر: +985632433001 پست الکترونیکی: Mehranhosseiny@yahoo.co.in

مقدمه

دیابت در نتیجه عدم ترشح کافی انسولین و یا عدم پاسخ سلول‌ها نسبت به این هورمون ایجاد می‌شود. در این حالت، بدن توان تنظیم قند خون را از دست داده و عموماً قند خون به شکل کنترل نشده‌ای افزایش می‌یابد (1). عدم مهار افزایش قند خون سبب آسیب به قسمت‌های مختلف بدن از جمله اعصاب و عروق خونی می‌شود (2). بیش از یک سوم مبتلایان به دیابت، در دوران ابتلا به این بیماری عوارض عصبی و عروقی به خصوص رتینوپاتی و نفروپاتی را تجربه می‌کنند (3). نفروپاتی دیابتی، عامل 14 درصد مرگ و میر ناشی از بیماری دیابت و 40 درصد نارسایی‌های کلیوی شناخته شده است (4). دیابت، با ایجاد تغییرات هم در بخش گلوامرولی و هم در بخش توبولی کلیه‌ها، سبب ایجاد نفروپاتی می‌شود (6). از مهمترین آسیب‌های نفروپاتی دیابتی در بخش گلوامرولی کلیه می‌توان به اسکروزیس، انتشار ماتریکس مزانشیال و ضخیم‌شدگی غشای پایه اشاره کرد (7). نفروپاتی با نشانه‌هایی چون: افزایش آلبومین ادرار، پرفشاری خون، ادم و کاهش پیشرونده فیلتراسیون گلوامرولی همراه است (8). عوامل اثرگذار بیوشیمیایی و مولکولی متعددی از جمله: افزایش قند خون، افزایش غلظت سرمی محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون، استرس اکسیداتیو، پروتئین کیناز C، التهاب و ... در نفروپاتی دیابتی شناسایی شده‌اند؛ با این حال عدم شناسایی مکانیسم دقیق مولکولی این بیماری، سبب وجود چالش در درمان آن شده است (9). در سال‌های اخیر شاهد معرفی گیاهان دارویی متعددی با خواص کاهنده قند خون هستیم. اما همچنان مطالعات اندکی در خصوص بررسی اثربخشی این گیاهان بر سایر عوارض ناشی از دیابت از جمله نفروپاتی وجود دارد (10). از جمله گیاهان دارویی با خواص کاهنده قند خون می‌توان به گردو (*Juglans regia* L) و اجزای مختلف آن اشاره کرد. مطالعات وسیعی در خصوص شناسایی اجزای گیاه‌شیمی قسمت‌های مختلف گیاه گردو از جمله: مغز، پوست میوه، برگ، پوست درخت و حتی ریشه این

گیاه انجام شده است. یافته‌های این مطالعات نشان می‌دهند که گیاه گردو یکی از منابع غنی ترکیبات پلی‌فنول به‌شمار می‌رود و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قسمت‌های مختلف این گیاه قابل ملاحظه می‌باشد (11). در مطالعات متعددی اثرات کاهنده قند خون، حفاظت قلبی و کاهش غلظت محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته که عامل اصلی نفروپاتی دیابتی می‌باشد، برای اجزای مختلف گردو گزارش شده است (12). در طب سنتی ایران، مصرف تیغه میانی میوه گردو برای درمان دیابت رواج دارد (13). نتایج مطالعات اخیر نیز اثرات کاهنده قند خون عصاره الکلی تیغه میانی گردو را در موش‌های دیابتی تأیید کرده‌اند (14، 15). با این حال تاکنون مطالعه‌ای در خصوص ارزیابی اثرات تیغه میانی گردو بر عملکرد کلیوی در نمونه انسانی و یا حیوانات دیابتی انجام نشده است؛ از این رو در این مطالعه به بررسی اثرات کلیوی مصرف عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو در مدل حیوانی نفروپاتی دیابتی پرداخته شد.

روش تحقیق

میوه گردو، از فروشگاه گیاهان دارویی در شهرستان بیرجند خریداری گردید. میوه گردو با کد هرباریوم 721، مورد تأیید گروه گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند قرار گرفت. تیغه میانی گردو، از تمامی میوه‌ها جدا گردید و سپس توسط آسیاب پودر شد. پودر به‌دست‌آمده، به‌نسبت 1:10 (وزنی/ حجمی) با محلول الکل 80% به‌مدت دو شبانه روز در دمای اتاق و بر روی همزن مغناطیسی خیسانده شد؛ سپس محلول به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی (Blue Ribbon, Grade 589; Germany) صاف شد. در نهایت، هر 10 سی‌سی از این محلول، در یک پتری‌دیش ریخته شد و در انکوباتور با دمای 40 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (16). پس از تبخیر کامل حلال، پودر باقی‌مانده در ظرف‌ها برداشته شد. در این روش عصاره‌گیری، به‌ازای هر 100 گرم پودر تیغه میانی گردو، 5 گرم عصاره هیدروالکلی

به دست آمد.

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در دامنه وزنی 160-180 گرم استفاده گردید. برای ایجاد نفروپاتی دیابتی در رت‌ها، پس از یک شب ناشتایی، یک دوز محلول آلوکسان مونوهیدرات 150mg/Kg به صورت درون صفاقی تزریق شد (17). پس از دو هفته، رت‌های با قند خون ناشتای بالای 350mg/dl، به عنوان رت‌های مبتلا به دیابت حاد در نظر گرفته شدند (18). برای پیشرفت عوارض دیابت و همچنین سازگارشدن حیوانات با محیط آزمایشگاه، حیوانات به مدت 4 هفته بدون انجام مداخله در شرایط کنترل شده (دمای 21-25 درجه سانتی‌گراد و چرخه نور/روشنایی 12 ساعته)، درون قفس‌های استاندارد از جنس پلی‌اتیلن در محل آزمایشگاه حیوانات مرکز تحقیقات طب تجربی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند نگهداری گردیدند. در طول طرح، رت‌ها دسترسی آزاد به غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی (شرکت جوانه خراسان - مشهد) و آب شهری سالم داشتند. روش کار با حیوانات در این طرح مطابق شرح پیش رو به تصویب کمیته اخلاق معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، رسید.

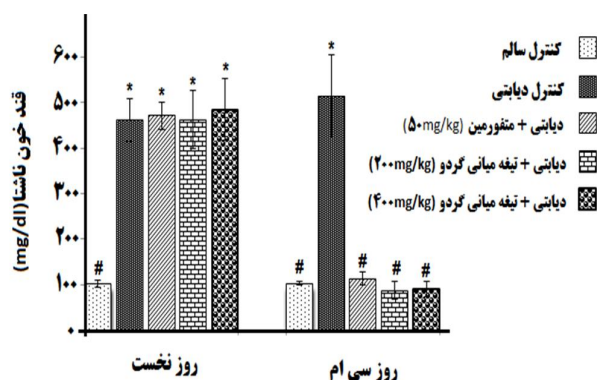
پس از گذشت زمان مذکور، به طور مجدد قند خون تمامی رت‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری قند خون جیبی (Accu Chek, Germany) ارزیابی گردید و 32 رت دیابتیک حاد که کمترین اختلاف را در مقادیر قند خون با یکدیگر داشتند، انتخاب گردیدند. 32 موش دیابتیک و 8 موش سالم، در پنج گروه مساوی قرار گرفتند. گروه‌های I و II دیابتیک به ترتیب: با دوزهای 200mg/kg و 400mg/kg عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو به صورت روزانه، گاواژ شدند. گروه III دیابتیک نیز به عنوان گروه کنترل مثبت، روزانه 50mg/kg متفورمین دریافت نمود (19). گروه IV کنترل دیابتیک (DC) و گروه کنترل سالم (NC)، روزانه، هم حجم مقدار گاواژ سایر گروه‌ها (1 میلی‌لیتر)، نرمال سالین دریافت نمودند. آلوکسان مونوهیدرات، محصول شرکت سیگما

آلدريج امریکا و قرص متفورمین از شرکت مرک (Merck Sante' s.a.s) فرانسه تهیه و استفاده گردید. برای تهیه کلیه محلول‌ها، از حلال سدیم کلراید 0/9 درصد استفاده گردید.

در روز بیست و نهم مداخله، تمام موش‌ها، در قفس‌های متابولیک قرار داده شدند تا نمونه 24 ساعته ادرار آنها برای اندازه‌گیری پروتئین گرفته شود. در روز سی‌ام، ضمن رعایت شرایط ناشتای 14 ساعته، رت‌ها پس از بیهوشی عمیق با اتر، مورد خونگیری قلبی قرار گرفتند و پلاسمای خون آنها برای انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی؛ کراتینین و نیتروژن اوره، جداسازی شد. در ادامه، کلیه راست موش‌ها برداشته شد و پس از توزین، برای انجام پروسه پاساژ بافتی، در محلول فیکساتیو بافر فرمالین 10 درصد قرار داده شد. اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی با استفاده از کیت‌های استاندارد (شرکت پارس‌آزمون - ایران) و دستگاه اتوآنالایزر (Prestige 24i-Japan) انجام گرفت. از نمونه‌های بافتی کلیه، پس از پاساژ روتین بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطع بافتی سریال با ضخامت حداکثر 5 میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم (Leits, Italy) تهیه شد و با تکنیک اسید پریودیک شیف (PAS)¹ رنگ‌آمیزی گردید. برای ارزیابی تغییرات بافتی، از هر موش سه لام و از هر لام 10 فیلد میکروسکوپی به وسیله میکروسکوپ نوری (UPlanFI, Japan) مشاهده شد و تصاویر، توسط دوربین دیجیتال (BX51, Japan) کالبره شده توسط لام هموسیستم متصل به میکروسکوپ، تهیه گردید. در مجموع 1200 گلومرول توسط نرم‌افزار آنالیز تصاویر میکروسکوپی (Image J 1.44p; National institute of Health, USA) مورد اندازه‌گیری کمی قرار گرفت. به طور خلاصه پارامترهای کمی شامل: درصد انتشار ماتریکس مزانشیال نسبت به کل کلافه گلومرولی (با اندازه‌گیری مساحت ناحیه PAS مثبت درون کلافه گلومرولی و کم کردن آن از مساحت کل کلافه گلومرولی)، اندازه فضای کل گلومرولی

¹ Periodic acid Schiff

بودند، علایم ظاهری آسیب چشمی (کاتاراکت دیابتی) را نشان دادند (شکل 1) که خود مؤید پیشرفت عوارض ناشی از هایپرگلیسمی در این حیوانات بود. در طول انجام پژوهش، یکی از موش‌های گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو (400mg/kg)، حدود 2 ساعت پس از گاوژ به علت کاهش شدید قند خون (43mg/dl) و به دنبال بروز علایم هیپوگلیسمی از بین رفت. داده‌های ارائه‌شده در نمودار یک، مقادیر قند خون ناشتای کلیه گروه‌ها را در ابتدا و انتهای مطالعه نشان می‌دهد. در این نمودار، نتایج مقایسه بین گروهی در دو مقطع زمانی (قبل از مداخله و بعد از مداخله) ارائه شده است؛ در حالی که در ابتدای انجام مطالعه، گروه‌های دیابتیک در مقایسه با گروه کنترل سالم قند خون بالاتری داشتند ($p \leq 0/0001$). مقایسه بین گروهی مقادیر قند خون در پایان مطالعه نشان داد که تیغه میانی گردو در هر دو دوز و همچنین داروی متفورمین به‌خوبی و به‌طور معنی‌داری قند خون را در موش‌های دیابتی، پس از 4 هفته کاهش دادند ($p \leq 0/0001$).



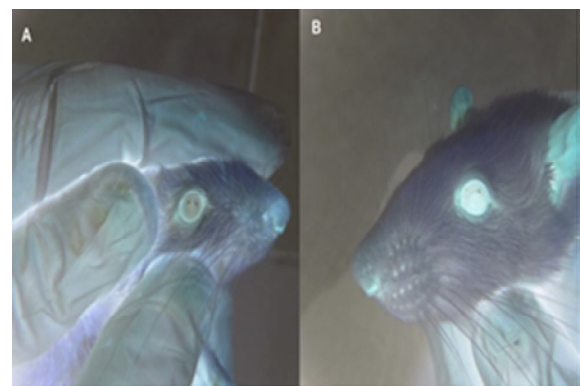
نمودار 1- مقایسه بین گروهی میانگین $\pm$ انحراف معیار قند خون قبل و بعد از تیمار. *تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم، # تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک.

(میکرو متر مربع) و درصد چسبندگی کلافه گلومرولی به کپسول بومن (%) محیط کلافه گلومرولی چسبیده به دیواره گلومرول) مورد سنجش قرار گرفتند. سایر تغییرات کیفی شامل ضخیم شدن کپسول بومن، هیالینیزاسیون، گشاد شدن مویرگهای گلومرول ها و اسکروزیس بصورت وجود دارد/ ندارد (1و0) در چک لیست ارزیابی هر گلومرول مد نظر قرار گرفت (20).

داده‌ها پس از جمع‌آوری، در نرم‌افزار SPSS (ویرایش 15) وارد گردید و توسط آمار توصیفی برای گروه‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و آمار تحلیلی و مقایسه‌ای با استفاده از آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی، با اطمینان 95%، مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

مقایسه مقادیر قند خون موش‌ها قبل از شروع آزمایش نشان داد که گروه‌های دیابتیک، قند خون حدود 4/5 برابر گروه کنترل سالم داشتند ($p \leq 0/0001$). در طول طرح نیز موش‌های گروه کنترل دیابتیک که به دیابت شدید مبتلا



شکل 1- عوارض میکروآنژیوپاتی ناشی از دیابت پس از یک مرحله هایپرگلیسمی شدید بروز می‌کند که عوارض چشمی به‌عنوان یکی از شاخص‌های سنجش غیر آزمایشگاهی مهم در تأیید ایجاد عوارض دیابت مطرح می‌باشد. کاتاراکت دیابتی وسیع به‌صورت کاملاً مشخص قابل ملاحظه است (A) در مقابل موش سالم (B).

داشتند ($p < 0/05$)، اما همچنان در مقایسه با گروه کنترل سالم، وزن موش‌ها کمتر بود ($p < 0/05$). داده‌های مربوط به مقادیر پروتئین ادرار، نیتروژن اوره و کراتینین خون در جدول 2 آورده شده است. موش‌های دیابتیک پس از 10 هفته (6 هفته قبل از شروع مطالعه و 4 هفته پس از آن) در مقایسه با موش‌های گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0/0001$) مقادیر پروتئین ادرار، نیتروژن اوره و کراتینین خون بالاتری داشتند. عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو در هر دو دوز توانست به‌طور مؤثری افزایش پارامترهای یادشده را در موش‌های دیابتی مهار نماید. داروی متفورمین به‌طور ضعیف‌تری سبب مهار پروتئین اوری شد، اما هیچ اثری را در مهار افزایش کراتینین و نیتروژن اوره خون نشان نداد.

نتایج بررسی متغیرهای فیزیولوژیک در جدول یک آورده شده است. موش‌های دیابتی، مقادیر حجم ادرار و نسبت وزن کلیه به وزن بدن بالاتری در مقایسه با گروه کنترل سالم داشتند ($p < 0/05$). اما وزن این موش‌ها در پایان مطالعه به‌طور معنی‌داری کمتر از موش‌های گروه کنترل سالم بود ($p < 0/05$). موش‌های دریافت‌کننده عصاره‌های تیغه میانی گردو، در هر دو دوز به‌طور معنی‌داری حجم ادرار کمتری در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک داشتند و مقادیر این پارامتر در این گروه‌ها در دامنه طبیعی بود و تفاوتی با گروه کنترل سالم نداشت. شاخص نسبت وزن کلیه به وزن بدن نیز در موش‌های دریافت‌کننده عصاره‌های تیغه میانی گردو به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل دیابتی بوده و در محدوده طبیعی قرار داشت. اگرچه موش‌های دریافت‌کننده عصاره تیغه میانی گردو در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک وزن بالاتری

جدول 1- مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار پارامترهای فیزیولوژیک؛ وزن رت، شاخص نسبت وزن کلیه به وزن بدن و حجم ادرار 24 ساعته در پایان مطالعه بین گروه‌ها

گروه‌ها	وزن رت (گرم)	نسبت وزن کلیه به وزن بدن (گرم:گرم)	حجم ادرار 24 ساعته (میلی لیتر)
کنترل سالم	249/50 $\pm$ 11/64 [#]	0/0039 $\pm$ 0/00038 [#]	8/16 $\pm$ 2/03 [#]
کنترل دیابتی	144/37 $\pm$ 9/03 ^{**}	0/0062 $\pm$ 0/00081 ^{**}	57/3 $\pm$ 20/12 ^{**}
دیابتی + متفورمین (50mg/kg)	177/37 $\pm$ 30/47 [*]	0/0041 $\pm$ 0/00051 ^{*#}	23/50 $\pm$ 2/56 ^{*#}
دیابتی + تیغه میانی گردو (200mg/kg)	195/62 $\pm$ 27/82 ^{*#}	0/0040 $\pm$ 0/00065 [#]	8/53 $\pm$ 2/57 [#]
دیابتی + تیغه میانی گردو (400mg/kg)	206/00 $\pm$ 8/86 ^{*#}	0/0037 $\pm$ 0/0010 [#]	8/75 $\pm$ 3/04 [#]

* تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم. ** تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم.

تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک

جدول 2- مقایسه میانگین $\pm$ انحراف معیار پارامترهای پروتئین ادرار، نیتروژن اوره و کراتینین خون در پایان مطالعه بین گروه‌ها

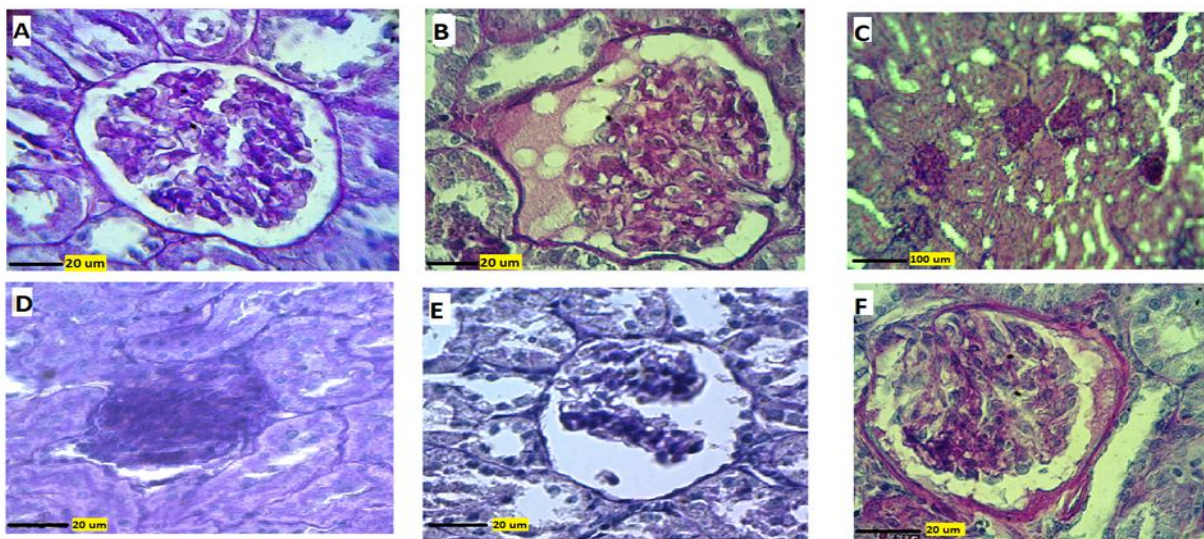
گروه‌ها	پروتئین ادرار (mg/day)	نیتروژن اوره خون (mg/dl)	کراتینین خون (mg/dl)
کنترل سالم	8/62 $\pm$ 0/87 [#]	12/9 $\pm$ 1/7 [#]	0/92 $\pm$ 0/03 [#]
کنترل دیابتی	48/12 $\pm$ 4/32 ^{**}	34/20 $\pm$ 6/21 ^{**}	2/28 $\pm$ 0/34 ^{**}
دیابتی + متفورمین (50mg/kg)	35/25 $\pm$ 4/02 ^{*#}	29/50 $\pm$ 4/53 ^{**}	1/65 $\pm$ 0/28 ^{*#}
دیابتی + تیغه میانی گردو (200mg/kg)	24/50 $\pm$ 3/54 ^{*#}	14/26 $\pm$ 7/3 [#]	1/31 $\pm$ 0/24 ^{*#}
دیابتی + تیغه میانی گردو (400mg/kg)	15/25 $\pm$ 2/37 ^{*#}	14/17 $\pm$ 1/6 [#]	1/36 $\pm$ 0/05 ^{*#}

* تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم. ** تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم.

تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک

گلوامرولی، انتشار ماتریکس مزانشیال و چسبندگی کلافه گلوامرولی به کپسول بومن جلوگیری کند. در بررسی کیفی، ضایعاتی نظیر: ضخیم‌شدگی کپسول بومن، هیالینیزاسیون و اسکروزیس نیز در این گروه‌ها به‌طور معنی‌داری کمتر مشاهده شد. داروی متفورمین تنها توانست به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) مانع افزایش چسبندگی کلافه گلوامرولی به کپسول بومن گردد، اما بر سایر ضایعات یادشده اثر قابل توجهی نداشت.

بررسی‌های بافت‌شناسی، عوارض پاتولوژیک شامل: بزرگ‌شدگی گلوامرولی، افزایش انتشار ماتریکس مزانشیال، چسبندگی کلافه گلوامرولی به کپسول بومن، ضخیم‌شدگی کپسول بومن، هیالینیزاسیون، اسکروز و گشادشدگی مویرگی (Capillary Dilatation) را در موش‌های دیابتیک نشان داد. شکل 2، ضایعات و آسیب‌های اشاره‌شده را نشان می‌دهد. طبق روش کار ارائه‌شده، این ضایعات به‌صورت کمی طبقه‌بندی گردیده و در قالب جدول 3 آورده شده است. بر این اساس، عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو در هر دو دوز توانست به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) از بزرگ‌شدگی



شکل 2- تصاویر بافتی ضایعات نفروپاتی دیابتی مشاهده‌شده در گروه‌های مورد مطالعه. بزرگنمایی 400X (به جز C). رنگ‌آمیزی PAS (A) گلوامرویل طبیعی، (B) هیالینیزاسیون، انتشار ماتریکس مزانشیال، گشادشدگی مویرگی‌های گلوامرولی و چسبندگی کلافه گلوامرولی به کپسول بومن در گروه دیابتیک، (C) گلوامرویل اسکروزیس گروه دیابتیک بزرگنمایی 100X، (D) گلوامرویل اسکروزیس و هایپرسولولاریتی گروه دیابتیک، (E) افزایش فضای ادراری در گروه دیابتیک، (F) ضخیم‌شدگی کپسول بومن در گروه دیابتیک.

جدول 3- مقایسه کمی تغییرات بافتی در بین گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	اندازه فضای گلوامرولی (میکرومتر مربع)	انتشار ماتریکس مزانشیال (درصد)	چسبندگی کلافه گلوامرولی به کپسول بومن (درصد)
کنترل سالم	22279/07±3331/40 [#]	7/1±2/72 [#]	5/64±1/82 [#]
کنترل دیابتی	36247/75±6756/23 ^{**}	23/42±3/47 ^{**}	21/81±4/75 ^{**}
دیابتی+متفورمین (50mg/kg)	323842±3914/72 ^{**}	18/11±9/5 ^{**}	6/73±3/06 [#]
دیابتی+تیغه میانی گردو (200mg/kg)	25673/39±4171/52 [#]	6/14±3/34 [#]	8/39±2/44 [#]
دیابتی+تیغه میانی گردو (400mg/kg)	25987/72±4182/62 [#]	8/46±2/58 [#]	6/56±1/01 [#]

تعداد گلوامرویل اندازه‌گیری‌شده برای هر گروه 240 گلوامرویل. * تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم، ** تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم، # تفاوت معنی‌دار ($p \leq 0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک.

بحث

در این مطالعه، با ایجاد یک مدل نفروپاتی دیابتی در موش صحرایی، اثرات مصرف عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو که به عنوان یک ترکیب با خواص آنتی دیابتیک شناخته شده است، مورد ارزیابی قرار گرفت. محققان این مطالعه، با بررسی ابعاد مختلف علایم کلینیکی ناشی از دیابت، به دنبال بررسی اثرات عصاره تیغه میانی گردو بر تمام این پارامترها بودند. یافته‌های این مطالعه به وضوح نشان داد که تغییرات ظاهری، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و پاتولوژیک مشاهده شده، مؤید ایجاد عوارض دیابت از جمله نفروپاتی دیابتی در موش‌ها بود. مصرف 4 هفته‌ای عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو در هر دو دوز توانست به خوبی برخی از تغییرات دیابتیک از جمله: افزایش قند خون، افزایش نسبت وزن کلیه به وزن بدن رت (بزرگ شدگی کلیوی)، افزایش حجم ادرار، افزایش نیتروژن اوره خون، افزایش انتشار ماتریکس مزانشیال، چسبندگی کلافه گلومرولی به کپسول بومن و بزرگ شدگی گلومرول‌ها را در موش‌ها مهار کند. این ترکیب همچنین مانع بروز برخی تغییرات کیفی پاتولوژیک ارزیابی شده مانند: هیالینیزاسیون، گشادشدگی مویرگ‌های گلومرولی، افزایش فضای ادراری و گلومرول اسکلروزیس گردید؛ اما در عین حال نتوانست کاهش وزن ناشی از دیابت را در مدت پژوهش جبران نماید. همچنین با وجود اینکه عصاره تیغه میانی گردو، افزایش پروتئین ادرار و کراتینین خون را در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک به طور معنی‌داری مهار نمود، اما نتوانست مقادیر آنها را در دامنه طبیعی نگهدارد.

این مطالعه برای اولین بار اثرات مربوط به عملکرد کلیوی مصرف عصاره تیغه میانی گردو را در رت‌های دیابتی شده با آلوکسان از منظر بیوشیمیایی و پاتولوژیک و به صورت کمی مورد ارزیابی قرار داد. اثرات کاهنده قند خون مشاهده شده در این پژوهش با یافته‌های قبلی دیگر محققین همخوانی داشت. در مطالعه حاجی‌خانی و همکاران که در سال 2010 منتشر گردید، عصاره الکلی تیغه میانی گردو در دوزهای 100،

200، 500 و 1000 میلی گرم بر کیلوگرم در مدت زمان 14 روز، اثرات هیپوگلاسمیک را در رت‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوسین نشان داد (15). در مطالعه مذکور، غلظت هورمون انسولین در موش‌ها افزایش نیافت؛ بنابراین محققین اثرات کاهنده قند خون تیغه میانی گردو را به مکانیسم‌هایی مانند: کاهش جذب روده‌ای و افزایش جذب بافتی گلوکز نسبت دادند. در راستای تأیید این فرضیه، نتایج مطالعه جدیدتر که توسط دهقانی و همکاران که در سال 2012 منتشر گردید نشان داد، مصرف دوهفته‌ای تیغه میانی گردو، در موش‌های سوری نژاد balb/c دیابتی شده با استرپتوزوسین در دوزهای 200، 400، 600 و 800 میلی گرم بر کیلوگرم، اثرات کاهنده قندخون غیر وابسته به دوز را نشان داد. اما مطالعه بافت‌شناسی سلول‌های پانکراس، تغییری را در راستای ترمیم سلول‌های بتای تخریب شده (مکانیسم اثر داروهای الفاکنده دیابت می‌باشد) نشان نداد (14). با توجه به مطالعات یاد شده و نتایج مطالعه پیش‌رو می‌توان به دو نکته سودمند بودن عصاره تیغه میانی گردو در کاهش قند خون و همچنین مکانیسم کاهش قند خون غیر وابسته به هورمون انسولین و دوز عصاره را مد نظر قرار داد.

امروزه به دلیل اینکه درمان قطعی برای امراض مزمن کلیوی نظیر نفروپاتی دیابتی وجود ندارد، غالباً بیماران به دنبال درمان‌های غیر متعارف نظیر استفاده از گیاهان دارویی هستند. در حالی که اقبال عمومی مردم به استفاده از گیاهان دارویی برای درمان امراض خود، روز به روز در حال افزایش است؛ اما متأسفانه مطالعات علمی اندکی در خصوص کارایی، اثرات سوء احتمالی و حتی سمیت گیاهان دارویی وجود دارد که این امر، ضرورت انجام تحقیقات علمی و بررسی اثرات گوناگون مصرف این ترکیبات را ایجاد کرده است (21). به طور کلی یافته‌های اخیر در خصوص مکانیسم‌های اثر گیاهان دارویی در درمان امراض کلیوی از جمله نفروپاتی دیابتی حول محورهای چون خواص: ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌فیبروتیک و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی

می‌شود. مصرف این ترکیبات حتی به دنبال عمل پیوند کلیه به منظور جلوگیری از اصطلاحاً پس‌زدن پیوند رایج بوده و توصیه می‌گردد (22).

اگرچه مطالعه خاصی، اثرات تنظیمی سیستم ایمنی را به گیاه گردو و قسمت‌های مختلف آن نسبت نداده‌اند اما با توجه به اینکه گیاهان دارویی با ترکیبات مؤثره نزدیک به این گیاه نظیر سیر دارای خواص ضد التهاب و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی می‌باشند (26)، می‌توان یکی از مکانیسم‌های اثر تیغه میانی گردو را در راستای کاهش ضایعات گلومرولی مرتبط با نفروپاتی دیابتی، اثرات تنظیم‌کننده سیستم ایمنی دانست.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب و نتایج ارائه‌شده در این مقاله می‌توان عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو را به عنوان ترکیبی با خواص کاهنده قند خون و جلوگیری‌کننده از پیشرفت نفروپاتی دیابتی معرفی نمود. احتمال می‌رود این اثرات وابسته به وجود ترکیبات مؤثره موجود در آن بوده که با مکانیسم‌هایی نظیر: کاهش التهاب، تنظیم سیستم ایمنی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش توان آنتی‌فیبروتیک، سبب مهار و کاهش ضایعات کلیوی ناشی از دیابت می‌گردد. این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که مصرف عصاره هیدرو الکلی تیغه میانی گردو، اثرات سمی به‌خصوص بر عملکرد کلیوی موش‌های دیابتی ندارد.

از جمله محدودیت‌های این طرح می‌توان به مدت‌زمان کوتاه مداخله و عدم اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی مرتبط با نفروپاتی دیابتی در آغاز مطالعه اشاره نمود که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از یافته‌های طرح پژوهشی با کد 695 تصویب‌شده در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بیرجند می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر

تکیه داشته و در غالب تحقیقات انجام‌شده در زمینه گیاهان دارویی، اثرات مشاهده‌شده، به این موارد نسبت داده شده‌اند (22).

التهاب و استرس اکسیداتیو، دو فرایند مرتبط و همسو با یکدیگر در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها از جمله نفروپاتی دیابتی هستند. بسیاری از گیاهان دارویی از جمله گردو به دلیل داشتن ترکیبات پلی‌فنولیک، فلاونوئید و ... دارای خواص آنتی‌اکسیدان و همچنین ضد التهاب می‌باشند (23).

فیروز کلیوی به عنوان آخرین مرحله بیماری مزمن کلیوی مطرح می‌باشد. ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌فیبروتیک، به عنوان بهترین مداخله در درمان بیماری‌های کلیوی از جمله نفروپاتی دیابتی مطرح می‌باشند. یافته‌های اخیر نشان دادند که بسیاری از ترکیبات مؤثره گیاهی، خواص آنتی‌فیبروتیک دارند. از جمله در یکی از تحقیقات نشان داده شد که مصرف عصاره غنی از پلی‌فنول پوست میوه گردو در رت‌ها توانسته است آسیب بافتی کبدی (فیروز) ناشی از تتراکلرید کربن را مهار نماید (24). قابل ذکر است بر اساس یافته‌های فیتوشیمی مطالعه شیمودا در سال 2008، بخش داخلی پوست میوه گردو (تیغه میانی جزء این بخش می‌باشد)، دارای مقادیر پلی‌فنول، فلاونوئید و خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری در مقایسه با پوست خارجی میوه است؛ بنابراین این‌طور تصور می‌شود که خواص آنتی‌فیبروتیک تیغه میانی باید بیش از پوست میوه گردو باشد.

در پاتوژنز نفروپاتی دیابتی، با تحریک شدن سیستم ایمنی، برخی سیتوکین‌ها نظیر: فاکتور تغییردهنده رشد بتا¹، فاکتور نکروزکننده تومر آلفا² و بسیاری دیگر از کینازها نظیر پروتئین کیناز C³ افزایش یافته و باعث تغییر رفتار سلولی که غالباً مرگ سلولی را به دنبال دارند، می‌شود (25). در طب سنتی برای درمان مراحل اولیه بیماری‌های کلیوی، از ترکیبات دارای خواص سرکوبگر سیستم ایمنی استفاده

¹ Transforming growth factor- β

² Tumor necrosis factor- α

³ Protein kinase C

و قدردانی خود را از معاونت محترم تحقیقات دانشگاه و همچنین کارشناسان محترم این معاونت خانم‌ها لطفی و ابوالقاسمی که در اجرای این پژوهش ما را یاری نمودند، اعلام می‌دارند. همچنین از جناب آقای مهندس محسن

منابع:

- 1- Chikhi I, Allali H, El Amine Dib M, Medjdoub H, Tabti B. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014; 4(3): 181-4.
- 2- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2004; 27 Suppl 1: S5-10.
- 3- Van Buren PN, Toto R. Current update in the management of diabetic nephropathy. *Curr Diabetes Rev*. 2013; 9(1): 62-77.
- 4- Arumugam S, Sreedhar R, Miyashita S, Karuppagounder V, Thandavarayan RA, Giridharan VV, et al. Comparative evaluation of torasemide and furosemide on rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Exp Mol Pathol*. 2014; 97(1): 137-43.
- 5- Jain A, Nahata A, Lodhi S, Singhai AK. Effects of *Tephrosia purpurea* and *Momordica dioica* on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2014; 4(3): 383-9.
- 6- Wang J, Liu H, Li N, Zhang Q, Zhang H. The Protective Effect of Fucoidan in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *Mar Drugs*. 2014; 12(6): 3292-306.
- 7- Fioretto P, Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2007; 27(2): 195-207.
- 8- Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16(3 suppl 1): S30-3.
- 9- Sun Y-M, Su Y, Li J, Wang L-F. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013; 433(4): 359-61.
- 10- Shafi S, Tabassum N, Ahmad F. Diabetic nephropathy and herbal medicines. *International Journal of Phytopharmacology*. 2012; 3(1): 10-7.
- 11- Almonte-Flores DC, Paniagua-Castro N, Escalona-Cardoso G, Rosales-Castro M. Pharmacological and Genotoxic Properties of Polyphenolic Extracts of *Cedrela odorata* L. and *Juglans regia* L. Barks in Rodents. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015; 2015: 187346.
- 12- Ahmad H, Khan I, Wahid A. Antiglycation and antioxidation properties of *Juglans regia* and *calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing. *J Tradit Chin Med*. 2012; 32(3): 411-4.
- 13- Zargari A. Medicinal plants. Tehran: Tehran University; 1997. [Persian]
- 14- Dehghani F, Mashhoody T, Panjehshahin M. Effect of aqueous extract of walnut septum on blood glucose and pancreatic structure in streptozotocin-induced diabetic mouse. *Iranian J Pharmacol Ther*. 2012; 11(1): 10-4.
- 15- Hajikhani R, Solati J. Effects of walnut alcoholic extract (*Juglans regia* L.) septum on serum glucose, insulin and activities of aminotransferase enzymes. *J Appl Chem Res*. 2010; 12: 17-23.
- 16- Hassanpour Fard M, Naseh G, Lotfi N, Hosseini SM, Hosseini M. Effects of aqueous extract of turnip leaf (*Brassica rapa*) in alloxan-induced diabetic rats. *Avicenna J Phytomed*. 2015; 5(2): 148-56.
- 17- Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *J Ethnopharmacol*. 2008; 115(2): 163-72.
- 18- Etuk EU. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 2010; 1(2): 130-4.

- 19- Dourandishan M, Hossieni M, Malekaneh M, Bagherzade G. Effect of *Otostegia persica*'s root extract on the blood biochemical factors in diabetic hyperlipidemic rats. Quarterly of Horizon of Medical Sciences. 2014; 20(1): 17-21. [Persian]
- 20- Appelhoff RJ, Hill JV, Findon G, Frampton CM, Perry E, Ponnampuruma D, et al. Differential contribution of diabetes and the Ren2 gene to glomerular pathology in diabetic (mREN-2)27 rats. Lab Invest. 2010; 90(8): 1225-35.
- 21- Zhong Y, Menon MC, Deng Y, Chen Y, He JC. Recent Advances in Traditional Chinese Medicine for Kidney Disease. Am J Kidney Dis. pii: S0272-6386(15)00644-7.
- 22- Zhong Y, Deng Y, Chen Y, Chuang PY, Cijiang He J. Therapeutic use of traditional Chinese herbal medications for chronic kidney diseases. Kidney Int. 2013; 84(6):1108-18.
- 23- Akbari V, Jamei R, Heidari R, Esfahlan AJ. Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. Food Chem. 2012; 135(4): 2404-10.
- 24- Shimoda H, Tanaka J, Kikuchi M, Fukuda T, Ito H, Hatano T, et al. Walnut polyphenols prevent liver damage induced by carbon tetrachloride and d-galactosamine: hepatoprotective hydrolyzable tannins in the kernel pellicles of walnut. J Agric Food Chem. 2008; 56(12): 4444-9.
- 25- Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. Vascu Pharmacol.. 2013; 58(4): 259-71.
- 26- Amirghofran Z. Herbal medicines for immunosuppression. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2012; 11(2): 111-9.

Abstract

Original Article

Effects of hydro.alcoholic extract of the internal septum of walnut on diabetic nephropathy in rats

Zahra Ghiravani¹, Mahmoud Zardast², Mohammad Hassanpour-Fard³, Mehran Hosseini⁴

Background and Aim: Due to the rapid growth of global interest in use of herbal medicine, their efficacy and safety evaluation have become important. In recent studies, internal septum of walnut fruit suggested as a hypoglycemic agent. Therefore, the present work was conducted to evaluate the effects of ethanolic extract of internal septum of walnut fruit (ISWF) on some biochemical and pathological aspects related to renal function in diabetic rats.

Materials and Methods: In this experimental research 32 acute Alloxan induced diabetic and 8 healthy rats divided into 5 equal group and treated orally once per day for 1 month as follow; diabetic groups I and II received 200 and 400 mg/kg of ISWF extracts, diabetic group III received 50 mg/kg metformin and diabetic group IV and healthy group received saline 0.9% as control groups. Finally, fasting blood glucose (FBG), 24h urine total protein (UTP), blood nitrogen urea (BUN) and plasma creatinine (Cr) were assessed biochemically and also quantitative and qualitative renal histopathological alterations for 1200 glomerulus were determined pathologically.

Results: In compare to diabetic control group, the ethanolic extract of ISWF in dose independence manner significantly reduced ($p \leq 0.05$) FBG, UTP, BUN and Cr, as well as glomerular space, tuft-to-capsule adhesion and mesangial matrix expansion in diabetic rats.

Conclusion: The ethanolic extracts of ISWF have beneficial effects on renal function in diabetic rats.

Key Words: Diabetic nephropathy; Herbal medicine; Internal septum of walnut fruit; rat

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2015; 22 (2): 104-114.

Received: June 12, 2015

Accepted: August 29, 2015

¹ Instructor, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

² Assistant Professor, Department of Pathology, Valiasr hospital, Faculty of medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

³ Assistant Professor, Department of physiology and pharmacology, Faculty of medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

⁴ Corresponding Author; Expert of Public Health, Research Center of Experimental Medicine, Deputy of Research and Technology, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. Mehranhosseiny@yahoo.co.in