

مقایسه اثرات درمانی لوواستاتین و ویتامین E بر حجم گلوامرول‌های کلیه در موش‌های صحرایی دیابتی

علی اکبر رجب‌زاده^۱، علیرضا ابراهیم‌زاده بیدسکان^۲، جواد حامی^۳، علیرضا رجب‌زاده^۴، الهام سرکی^۵

چکیده

زمینه و هدف: نفروپاتی شایع‌ترین عارضه دیابت است. بیان شده که استرس‌های اکسیداتیو نقش مهمی در پاتونوز نفروپاتی دارند. از طرفی لوواستاتین و ویتامین E باعث تأخیر در پیشرفت نفروپاتی می‌گردند. هدف تحقیق حاضر، بررسی تأثیر داروهای لوواستاتین و ویتامین E بر حجم کلیه و گلوامرول‌ها در کلیه‌های دیابتی می‌باشد.

روش تحقیق: چهل عدد موش صحرایی نر از نژاد ویستار، به صورت تصادفی به پنج گروه تقسیم شد. گروه اول به عنوان گروه کنترل و گروه‌های دوم تا پنجم، به عنوان گروه‌های آزمایش که توسط استرپتوزوسین (60 mg/kg) به صورت داخل صفاقی دیابتی شدند، در نظر گرفته شدند. شصت روز پس از القاء دیابت، گروه سوم، تحت درمان با لوواستاتین (10 mg/kg/day)، گروه چهارم تحت درمان با ویتامین E (100 IU/kg) و گروه پنجم تحت درمان همزمان با داروهای فوق قرار گرفتند. پس از اتمام دوره درمان، موش‌های صحرایی بیهوش و کلیه‌های آنها برداشته شد. پس از رنگ‌آمیزی، مقاطع جهت تخمین حجم کل کلیه و گلوامرول‌ها با استفاده از قانون کواویری مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهند که حجم کل کلیه و حجم گلوامرول‌ها در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.01$). درمان با لوواستاتین منجر به کاهش معنی‌دار حجم کل گلوامرول‌ها در مقایسه با گروه دیابتی شد ($P < 0.01$)؛ هر چند حجم کل گلوامرول‌ها در گروه تحت درمان با ویتامین E در مقایسه با گروه دریافت‌کننده لوواستاتین و گروه دریافت‌کننده همزمان دو دارو کاهش بیشتری از خود نشان داد ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد تجویز لوواستاتین و ویتامین E اثرات محافظتی بر روی کلیه موش‌های صحرایی دیابتی داشته و در نتیجه باعث بهبود آسیب‌های عملکردی و ساختاری گلوامرولی ناشی از دیابت می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: نفروپاتی دیابتی، حجم گلوامرولی، ویتامین E، لوواستاتین.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۰؛ ۱۸(۳): ۱۵۹-۱۶۷

دریافت: ۱۳۸۹/۰۸/۲۹ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۲۵

^۱ نویسنده مسؤؤل؛ دانشجوی دکتری تخصصی علوم تشریح، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
آدرس: مشهد - میدان آزادی - پردیس دانشگاه - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی
تلفن: ۰۵۱۱-۷۵۳۱۴۵۵-۰۵۱۱ نمابر: ۰۵۱۱-۸۰۰۲۴۸۴ پست الکترونیکی: Rajabzadeh86@gmail.com
^۲ استادیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
^۳ دانشجوی دکتری تخصصی علوم تشریح، گروه علوم تشریحی و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
^۴ دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی - تکوینی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران
^۵ دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

مقدمه

دیابت ملیتوس یک اختلال غدد درون‌ریز است که با مشکلات عروق بزرگ و کوچک و نیز یک‌سری عوارض غیر عروقی همراه است (۱). در این بیماری، افزایش قند و چربی‌های خون و همچنین افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن، باعث ایجاد گومرول‌واسکلروزیس و آسیب بافت بینابینی کلیه می‌شود. همچنین، کاهش پیشرونده میزان فیلتراسیون گومرولی باعث کاهش یا فقدان عملکرد نفرون‌ها گشته، در نتیجه نفروپاتی ایجاد می‌گردد (۲ و ۳).

نفروپاتی، شایع‌ترین عارضه در بیماری دیابت وابسته به انسولین می‌باشد به طوری که حدود ۵۰٪ این بیماران به دنبال پیشرفت بیماریشان دچار نارسایی مزمن کلیه می‌شوند (۴). افزایش رشد مویرگ‌های گومرولی و در نتیجه هایپرتروفی گومرولی، به عنوان یکی از اولیه‌ترین پاسخ‌ها به هایپرگلیسمی در مطالعات قبلی بیان شده‌اند. همچنین مطالعات قبلی نشان داده‌اند که متوسط حجم گومرولی در افراد دیابتی نسبت به افراد سالم به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد، به طوری که این افزایش تقریباً تا ۲ برابر می‌تواند باشد (۵).

داروی لوواستاتین، در واقع مهارکننده رقابتی آنزیم HMG-CoA ردوکتاز (آنزیم آلوستریگ مسیر سنتز کلسترول) می‌باشد. بنابراین، با مهار این آنزیم توسط داروی مذکور می‌توان سنتز کلسترول در بدن را کاهش داد. به دنبال این امر، میزان LDL کل پلاسما را که در بیماری دیابت افزایش می‌یابد، می‌توان کاهش داد. از آنجائی که LDL بالای پلاسما عامل مهمی در پیشرفت آسیب‌های گومرولی ناشی از دیابت می‌باشد (۶،۷)، لذا احتمال می‌رود با کنترل آن توسط داروی لوواستاتین، بتوان از شدت یافتن این آسیب‌ها جلوگیری کرده یا حداقل میزان آنها را کاهش داد.

ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی کاملاً شناخته شده است. مطالعات قبلی به خوبی نشان داده‌اند که

ویتامین E به طور غیر مستقیم و بدون کاهش چربی خون می‌تواند باعث کاهش آترواسکلروزیس شود (۷،۸). همچنین این نشان داده شده که LDL‌های اکسیدشده نقش مهمی در پاتوژنز گومرول‌واسکلروزیس ناشی از دیابت دارند و درمان با ویتامین E از اکسیداسیون LDL و تولید رادیکال‌های آزاد جلوگیری کرده که در نهایت منجر به کاهش میزان گومرول‌واسکلروزیس می‌گردد (۹). از آنجائی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای داروی لوواستاتین کاملاً تأیید نشده است، این احتمال وجود دارد که ترکیب کردن ویتامین E با لوواستاتین اثرات سودمندی بر روی عملکرد آندوتلیوم عروق گذاشته و در نتیجه باعث کاهش گومرول‌واسکلروزیس گردد. به همین دلیل در مطالعه‌ی حاضر سعی شده است اثرات دوز درمانی لوواستاتین و ویتامین E بر حجم گومرول‌های کلیه در موش‌های صحرایی دیابتی با استفاده از روش کوالیری مورد بررسی قرار گیرد.

روش تحقیق

تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی است که جهت انجام آن چهل عدد موش صحرایی نر از نژاد ویستار در محدوده وزنی 110 ± 5 گرم از مؤسسه رازی حصارک کرج تهیه شد. موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت 22 ± 3 درجه‌ی سانتی‌گراد با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. سپس به پنج گروه هشت‌تائی به شرح ذیل تقسیم شدند: گروه اول به عنوان گروه شاهد (کنترل سالم)، گروه دوم به عنوان گروه شاهد مثبت (کنترل بیمار) که توسط داروی استرپتوزوسین با دوز 60 mg/kg (سه دوز متوالی 20 mg/kg با فواصل ۲۴ ساعت) به صورت تزریق داخل صفاقی در آنها دیابت القا شد (۱۰)، گروه سوم به عنوان گروه درمان که پس از القای دیابت توسط داروی استرپتوزوسین و تأیید نفروپاتی دیابتی هشت هفته (۱۱) پس از اولین تزریق استرپتوزوسین، تحت درمان با داروی لوواستاتین (حل شده با آب مقطر و اتانول) به میزان

۱۰mg/kg روزانه به صورت خوراکی (گاواژ) به مدت ۴ هفته

قرارگرفتند (۱۲)، گروه چهارم نیز به عنوان گروه درمان که پس از القای دیابت توسط داروی استرپتوزوسین و تأیید نفروپاتی دیابتی تحت درمان با داروی ویتامین E، به میزان ۱۰۰ IU/kg روزانه به صورت تزریق داخل عضلانی به مدت ۴ هفته قرارگرفتند (۱۳) و گروه پنجم نیز به عنوان گروه درمان که پس از القای دیابت توسط داروی استرپتوزوسین و تأیید نفروپاتی دیابتی تحت درمان همزمان با داروهای لوواستاتین به میزان ۱۰ mg/kg به صورت خوراکی و ویتامین E به میزان ۱۰۰ IU/kg به صورت تزریق داخل عضلانی به مدت ۴ هفته قرارگرفتند. به حیوانات گروه یک تا پایان دوره آب مقطر حاوی اتانول به جای آب آشامیدنی و به حیوانات گروه دو تا پنج پس از تأیید دیابت در آنها برای حفظ تعادل یونی، محلول ۰/۵٪ سدیم کلراید در آب مقطر به جای آب آشامیدنی تا پایان دوره داده شد. به منظور تأیید و تثبیت دیابت، قند خون حیوانات قبل از القای دیابت، ۴۸ ساعت بعد از القای دیابت و یک هفته پس از القای دیابت اندازه‌گیری و ثبت شد. به طور کلی قند خون بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر به عنوان ملاک دیابتی بودن در نظر گرفته شد. به منظور تشخیص و تأیید نفروپاتی دیابتی، پس از اثبات دیابت در موش‌های گروه‌های مورد آزمایش، هفته‌ای یک‌بار، نمونه ادرار آنها توسط نوارهای سنجش پروتئین در ادرار جهت تأیید پروتئینوری مورد بررسی قرارگرفت (۱۴).

پس از پایان دوره درمان، حیوانات توسط دی اتیل اتر بیهوش و کلیه‌های آنها خارج و در فیکساتیو Lillie به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند (۱۵). پس از ثبوت کامل، از هر حیوان یکی از کلیه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و در آگار ۷٪ قالب‌گیری شدند. بلافاصله پس از قالب‌گیری، قالب حاوی کلیه به قطعات ۱ میلی‌متری بریده شد. سپس برش‌ها با حفظ جهت قدامی-خلفی مورد پاساژ بافتی قرار گرفتند (۱۶). از هر قالب پارافینی یک برش ۷ میکرونی تهیه و با تکنیک‌های هماتوکسیلین-آئوزین و PAS رنگ‌آمیزی شدند

(۱۵).

قانون کوالیری، که روشی دقیق و فاقد تورش می‌باشد، به عنوان استاندارد طلایی و رایج‌ترین شیوه در استریولوژی برای محاسبه حجم مرجع مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، سری برش‌های موازی با فاصله‌ی ثابت (یک میلی‌متر) تهیه شده، سپس با محاسبه مجموع سطح مقطع (A) تمام مقطع و ضرب کردن در ضخامت بین مقاطع (t) حجم محاسبه می‌شود (۱۶):

$$V = (A_1.t) + (A_2.t) + \dots + (A_m.t) = \sum_{i=1}^m A_i.t$$

از آنجائی که موقعیت اولین مقطع کاملاً تصادفی است، عدم سوگیری و تورش تضمین شده است (۱۷). سطح مقطع با استفاده از گریدهای شمارش نقاط استریولوژیک که به صورت تصادفی با سطح مقطع مورد نظر برخورد می‌نمایند محاسبه می‌شود. برای انجام این محاسبات لازم است که ابتدا قلمروی اطراف هر نقطه (Area of Point; a/p) محاسبه شود. از آنجائی که نقطه فاقد بعد است، از گریدهایی متشکل از علائم صلیبی که دارای دو بعد هستند، استفاده شد. در یک شبکه متشکل از علامات صلیبی دو بعدی، فاصله بین دو نقطه در دو محور X و Y قابل اندازه‌گیری می‌باشد. این فواصل به ترتیب ΔX و ΔY می‌باشند، بنابراین، متوسط مساحت اطراف هر یک از صلیب‌ها (a/p) عبارت از حاصل ضرب این دو فاصله با یکدیگر است (۱۷، ۱۱):

$$\frac{a}{P} = \Delta X \cdot \Delta Y$$

در این حالت، شبکه علامت‌های صلیبی به صورت شبکه نقاط در نظر گرفته می‌شود. عموماً نقطه به گوشه بالا و سمت راست نسبت داده می‌شود. اگر آن گوشه از صلیب با پروفیل (بخشی از مقطع بافتی که قرار است حجم آن محاسبه گردد به عنوان مثال گلومرول کلیه) مقطع مورد نظر برخورد کند، حتی در صورتی که سه گوشه دیگر با پروفیل مورد نظر برخورد نداشته باشند، آن علامت شمرده می‌شود، در غیر این صورت از شمارش آن خودداری می‌شود (۱۷، ۱۱). برای

(ANOVA) و آزمون توکی توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۱/۵ صورت گرفت. نتایج حاصل به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بیان شده است. فاصله اطمینان ۹۵٪ مورد قبول و خارج آن غیر قابل قبول و ($P < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی استرپتوزوسین با دوز ۶۰ mg/kg مورد بررسی قرار گرفت به طوری که میانگین غلظت قند خون، ۴۸ ساعت و ۷ روز بعد از آخرین تزریق استرپتوزوسین در مقایسه با گروه کنترل در روزهای مشابه به ترتیب با $P < 0.05$ و $P < 0.001$ افزایش معنی‌داری از خود نشان داد (جدول ۱). از طرفی، نمونه ادرار موش‌ها، ۴ هفته پس از القای دیابت توسط نوارهای سنجش مخصوص پروتئین در ادرار رنگ سبز از خود نشان داد که به دنبال مقایسه شدت رنگ حاصله با شاخص راهنمای نوار مربوطه، میزان پرتئینوری در این گروه (++) بود.

جدول ۱- مقایسه میانگین غلظت قند خون غیرناشتا قبل و پس از تزریق استرپتوزوسین (۶۰ mg/kg) (میانگین \pm انحراف معیار)

سطح معنی‌داری	دیابتی	کنترل	گروه
---	۱۰۴/۲ \pm ۸/۳	۱۰۳/۸ \pm ۷/۳	زمان
$P < 0.05$	۱۵۳/۴ \pm ۱۴/۲	۱۰۷ \pm ۲/۹	قبل از تزریق
$P < 0.001$	۴۱۷/۸ \pm ۲۸/۷	۹۵ \pm ۱/۸	۲ روز پس از تزریق
			۷ روز پس از تزریق

تغییرات هیستوپاتولوژیک

تصاویر میکروسکوپ نوری از گلومرول‌های کلیه دو ماه پس از القای دیابت در مقایسه با گروه کنترل هایپرتروفی گلومرولی و همچنین افزایش تعداد سلول‌ها در گلومرول‌های کلیه را نشان داد که بیانگر یک گلومرولواسکلروزیس کانونی بود، همچنین آسیب گلومرولی در این حیوانات، با افزایش ماتریکس خارج سلولی در بافت بینابینی کلیه همراه بود (شکل ۱).

محاسبه حجم، با استفاده از یک پروژکتور متعارف، کل تصویر نمونه روی لام، بر روی میز کار انداخته شده، سپس بزرگنمایی تصویر حاصل محاسبه شده، که برابر با ۲۲/۷۵ بود؛ این بزرگنمایی در تمام مراحل آزمایش و برای تمام نمونه‌ها ثابت نگه داشته شد. سپس شبکه صلیبی استاندارد بر روی تصویر به صورت کاملاً تصادفی و بدون هیچ‌گونه سوگیری انداخته شد. شمارش نقاط مطابق با اصول ذکر شده انجام شد و حجم کل کلیه و کل گلومرول‌ها از رابطه زیر محاسبه شد (۱۸،۱۶):

$$V = \frac{\sum_{i=1}^m p \cdot a / p \cdot \bar{t}}{M^2}$$

$\frac{a}{p}$ قلمروی اطراف هر نقطه و برابر با ۵۰ میلی‌متر مربع، \bar{t} متوسط ضخامت مقاطع برابر با یک میلی‌متر و M^2 مجذور بزرگنمایی برابر با ۵۱۷/۵۶ بود. معیارهای فوق در تمام مراحل آزمایش استریولوژیک ثابت نگه داشته شد. جهت محاسبه حجم گلومرول‌ها، ابتدا کسر حجمی گلومرول‌ها از رابطه زیر و با کمک شبکه صلیبی نقاط محاسبه گردید (۱۷):

$$V_{v(y,ref)} = P_{p(y,ref)} = \frac{P_{(y)}}{P_{(ref)}} = \frac{\sum_{i=1}^m P(\text{glom})}{\sum_{i=1}^m P(\text{total kidney})}$$

$$\sum_{i=1}^m P(\text{glom})$$

نماینده تعداد نقاطی است که با

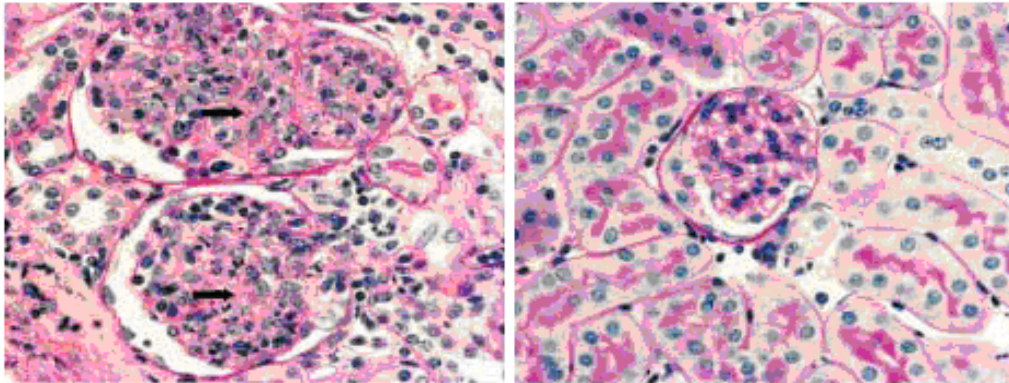
گلومرول‌ها برخورد می‌نماید.

نشانه‌دهنده مجموع نقاطی است $\sum_{i=1}^m P(\text{total kidney})$

که با حجم مرجع (کل کلیه) برخورد می‌کند. سپس حجم کل گلومرول‌ها از رابطه‌ی زیر حساب شد (۱۶):

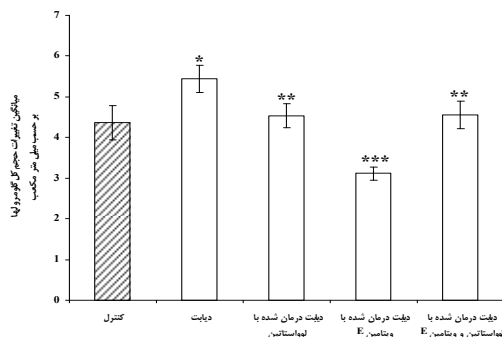
$$V_v(\text{Total Glomeruli}) = V_v(\text{total kidney}) \cdot V_v(\text{glom, total kidney})$$

تجزیه و تحلیل اطلاعات کمی به دست آمده از روش‌های استریولوژیک، با روش آماری آنالیز واریانس



شکل ۱- تصویر میکروسکوپ نوری از گلومرول‌های گروه کنترل (راست) و گروه دیابت هشت هفته پس از القاء دیابت (چپ). به هیپرتروفی گلومرولی و افزایش تعداد سلول‌ها در گلومرول‌های دیابتی توجه نمائید. پیکان‌ها، افزایش ماتریکس خارج سلولی را نشان می‌دهند. رنگ آمیزی PAS-Hematoxylin - 100x

از تأیید نفروپاتی دیابتی تحت درمان همزمان با داروهای لوواستاتین و ویتامین E به مدت ۴ هفته قرار داشتند برابر با $0.34 \pm 4/56$ میلی‌متر مکعب بود که در مقایسه با گروه دیابت درمان‌نشده (شاهد مثبت) کاهش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0.01$).



نمودار ۱- میانگین تغییرات حجم کل گلومرول‌ها بر حسب میلی‌متر مکعب

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل $P < 0.01$. ** اختلاف معنی‌دار با گروه

دیابت $P < 0.01$. *** اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت $P < 0.001$

تغییرات حجم کل کلیه

میانگین حجم کل کلیه در گروه شاهد پس از پایان دوره آزمایش برابر با $8/44 \pm 208/77$ میلی‌متر مکعب اندازه‌گیری شد، در حالی که میانگین حجم کل کلیه در

تغییرات حجم کل گلومرول‌ها

پس از پایان دوره آزمایش، میانگین حجم کل گلومرول‌ها در گروه شاهد اندازه‌گیری شد که برابر با $0.42 \pm 4/37$ میلی‌متر مکعب بود. از طرفی، میانگین حجم کل گلومرول‌ها در گروه دیابت پس از گذشت ۲ ماه از القای دیابت، برابر با $0.43 \pm 5/44$ میلی‌متر مکعب بود که در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0.001$) (جدول ۲)، در حالی که میانگین حجم کل گلومرول‌ها در گروهی که پس از تأیید نفروپاتی دیابتی تحت درمان با داروی لوواستاتین به مدت ۴ هفته قرار داشتند برابر با $0.29 \pm 4/53$ میلی‌متر مکعب بود که در مقایسه با گروه دیابت درمان‌نشده (شاهد مثبت) کاهش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0.01$) (جدول ۲). همچنین، میانگین حجم کل گلومرول‌ها در گروهی که پس از تأیید نفروپاتی دیابتی تحت درمان با داروی ویتامین E به مدت ۴ هفته قرار داشتند برابر با $0.15 \pm 3/11$ میلی‌متر مکعب بود که در مقایسه با گروه دیابت درمان‌نشده (شاهد مثبت) کاهش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0.001$). از طرفی، میانگین حجم کل گلومرول‌ها در گروهی که پس

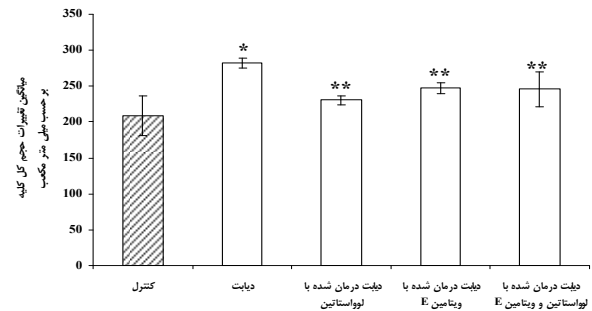
بحث

نفرورپاتی دیابتی شایع‌ترین بیماری مزمن کلیه بوده که در نهایت می‌تواند منجر به انجام دیالیز و حتی پیوند کلیه گردد (۱۹). گلومرولواسکلروزیس منتشر و یا ندولار، آتروفی و فیروزه شدن بافت بینابینی کلیه و افزایش تدریجی پروتئینوری در این بیماری اتفاق می‌افتد (۲۰). نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیان می‌دارد که داروهای لوواستاتین و ویتامین E، از افزایش حجم کل کلیه و نیز گلومرول‌های کلیه که به دنبال دیابت ایجاد می‌شود، به مقدار قابل توجهی جلوگیری می‌نمایند.

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که لوواستاتین مستقیماً می‌تواند باعث کاهش تکثیر سلول‌های مزانژرال و نیز کاهش تولید مواد کموتاکتیک مترشحه از مونوسیت‌ها شوند که این امر به نوبه‌ی خود منجر به کاهش آسیب‌های گلومرولی و در نتیجه کاهش پیشرفت نفرورپاتی می‌گردد. از طرفی لوواستاتین فیلتراسیون گلومرولی کاهش یافته و آسیب گلومرولی ناشی از دیابت را بهبود می‌بخشد (۱۲). همچنین این دارو با مهار بیان ژن فاکتور رشد تغییر شکل دهنده β در جلوگیری از هیپرتروفی گلومرولی ناشی از دیابت نقش مهمی دارد (۲۱). همچنین مطالعات جدید بیان کرده‌اند که میزان بیان پروتئین کیناز فعال‌کننده میتوزن p38 و همچنین فاکتور تغییر شکل دهنده بتا-یک (-TGF- β 1) و فیبرونکتین و لامینین در گلومرول‌های دیابتیک در مقایسه با گروه کنترل به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد، که به دنبال درمان با داروی لوواستاتین، بیان این فاکتورها کاهش پیدا می‌کند. در واقع داروی لوواستاتین، با کاهش تجمع ماتریکس خارج سلولی باعث ایجاد اثرات محافظتی بر روی آسیب‌های گلومرولی ناشی از دیابت می‌شود (۶).

در مطالعه حاضر حجم کل کلیه و گلومرول‌های کلیه در موش‌های دیابتی تحت درمان با لوواستاتین در مقایسه با موش‌های دیابتی درمان‌نشده، کاهش قابل ملاحظه‌ای از خود نشان داد. از آنجایی که کاهش حجم گلومرول‌ها

گروه دیابت پس از گذشت ۲ ماه برابر با $282/34 \pm 6/59$ میلی‌متر مکعب اندازه‌گیری شد که در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0/01$)



نمودار ۲- میانگین تغییرات حجم کل کلیه * اختلاف معنی‌دار با گروه

کنترل $P < 0/01$. ** اختلاف معنی‌دار با گروه دیابت $P < 0/01$

از طرفی، میانگین حجم کل کلیه در گروهی که پس از تأیید نفرورپاتی دیابتی تحت درمان با داروی لوواستاتین به مدت ۴ هفته قرار داشت برابر با $230/58 \pm 6/58$ میلی‌متر مکعب بود که در مقایسه با گروه دیابت درمان‌نشده (شاهد مثبت) کاهش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0/01$). همچنین، میانگین حجم کل کلیه در گروهی که پس از تأیید نفرورپاتی دیابتی تحت درمان با داروی ویتامین E به مدت ۴ هفته قرار داشت برابر با $247/07 \pm 8/13$ میلی‌متر مکعب بود که در مقایسه با گروه دیابت درمان‌نشده (شاهد مثبت) کاهش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0/01$). در حالی که میانگین حجم کل کلیه در گروهی که پس از تأیید نفرورپاتی دیابتی تحت درمان همزمان با داروهای لوواستاتین و ویتامین E به مدت ۴ هفته قرار داشتند برابر با $245/64 \pm 9/51$ میلی‌متر مکعب بود که در مقایسه با گروه دیابت درمان‌نشده (شاهد مثبت) کاهش معنی‌داری از خود نشان داد ($P < 0/01$).

تحت درمان با ویتامین E در مقایسه با رت های دیابتی درمان نشده، کاهش قابل توجهی نشان داد. LDLهای اکسیدشده نقش مهمی در پاتوژنز گلومرولوپاتی ناشی از دیابت دارند و از طرفی چون درمان با ویتامین E، از اکسیداسیون LDL و حتی تولید رادیکال های آزاد جلوگیری می کند، بنابراین میزان گلومرولوپاتی دیابتی را به طور قابل توجهی می تواند کاهش دهد (۲۵).

نتیجه گیری

افزایش رادیکال های آزاد و LDL بالای پلاسما، در روند پاتوژنز نفروپاتی دیابتی دخیل اند. بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر، به نظر می رسد تجویز داروهای لوواستاتین و ویتامین E، اثرات محافظتی بر روی کلیه موش های صحرایی دیابتی داشته و در نتیجه باعث بهبود آسیب های عملکردی و ساختاری گلومرولی ناشی از دیابت گردند.

تقدیر و تشکر

در پایان از معاونت محترم پژوهشی و اعضای محترم شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اهواز به خاطر تأیید طرح تحقیقاتی و تأمین بودجه مورد نظر صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می آید.

نسبت به کاهش حجم کل کلیه اختلاف فاحشی دارد، نتیجه گیری می شود که احتمالاً در بین سایر اجزای کلیه بیشترین تأثیر درمانی داروی لوواستاتین بر روی گلومرول ها متمرکز است. این مطلب، نتایج مطالعات قبلی را مبنی بر اینکه استاتین ها با کاهش میزان پروتئینوری و حتی گلومرولواسکلروزیس نقش مهمی در بهبود آسیب های گلومرولی ناشی از دیابت دارند (۲۲) را تأیید می نماید.

ویتامین E پراکسیداسیون افزایش یافته لیپیدها را در حیوانات دیابتی کاهش می دهد که این خود نهایتاً منجر به آهسته تر شدن روند شروع نفروپاتی دیابتی می گردد (۲۳). همچنین در مطالعات قبلی این امر تأیید شده است که حجم گلومرول های کلیه در موش های صحرایی دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایشی حدود دو برابر داشته که درمان با ویتامین E توانسته است این میزان افزایش حجم گلومرولی را به طور قابل ملاحظه ای کاهش دهد (۲۴). همچنین میزان بیان $TGF-\beta$ در گلومرول های دیابتی افزایش می یابد که این عامل خود باعث افزایش ماتریکس خارج سلولی در گلومرول ها و در نتیجه افزایش اندازه یا حجم آن ها می شود. درمان با ویتامین E از افزایش میزان بیان $TGF-\beta$ جلوگیری کرده، در نتیجه احتمالاً این عامل، یکی از عواملی است که باعث کاهش حجم گلومرول های کلیه می شود (۲۴). در این مطالعه نیز حجم کل کلیه و حجم گلومرول های کلیه در موش های صحرایی دیابتی

منابع:

- 1- Montilla P, Barcos M, Munoz M, Castaneda I, Tunes I. Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Biol.* 2005; 38(5): 539-544.
- 2-Okutan H, Ozcelik N, Yilmaz HR and Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem.* 2005; 38 (2): 191-196.
- 3-Yamabe N, Yokozawa T, Oya T and Kim M. Therapeutic potential of epigallocatechin 3-Ogallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006;319(1): 228-236.
- 4- Ritchie A.C. *Bodys Textbook of pathology.* 9th Edition. Lea & Febiger. London.1990:806 -10.
- 5- Jean Macleod. Measurement of glomerular volume in needle biopsy specimens. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 239-243.

- 6-Wang LH, Duan HJ, Shi YH, Liu QJ, He N, Liu SX. Effects of lovastatin on renal function and expression of phosphorylating p38 mitogen-activated protein kinase in experimental diabetic nephropathy in rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2004; 16(12): 734-7.
- 7- Michael RR, Erwin KK, Steven KH, Susan LP, Julie AS, Linda MJ, et.al. *Drug facts and comparisons*. 54Th Edition. U.S.A.: Awolters Kluwer Company; 2000.
- 8- Namayandeh SM, Emami-Meybody M, SadreBafghi SM, Yeganehfard S, Kamran M and Motafaker M. Vitamin E supplement blocks the response of HDL to lovastatin therapy in hypercholesterolemic patients. *Acta Medica Iranica*. 2007; 45(4): 277-281.
- 9-Salonen RM, Nyssönen K, Kaikkonen J, Porkkala SE, Voutilainen S, Rissanen TH, et.al. Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention study. Six-year effect of combined vitamin C and E supplementation on atherosclerotic progression: the antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study. *Circulation*. 2003; 25; 107(7): 947-953.
- 10- Abo-Slem OM, El-edel RH, Harisa GE, El-halawany N, Ghonaim MM. Experimental diabetic nephropathy can be prevented by Propolis: Effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pak J Pharm Sci* 2009; 22(2): 205-210.
- 11-Heidari Z, Sagheb HR, Rafighdoost H, Moein AA, Noori Mougehi MH , Minaii B. A stereological study of diabetic kidney following administration of different doses of streptozotocin. *DARU*.2003;11; 3: 45-50. [Persian]
- 12-Inman SR, Stowe NT , Cressman MD. Lovastatin preserves renal function in experimental diabetes. *Am J Med Sci APR*. 1999; 317(4):215-21.
- 13- Trachman H, Chan JCM, Chan W, Valaderama E, Brandt R, Wakely P,et.al. Vitamin E Ameliorates Renal Injury in an Experimental Model of Immunoglobulin A Nephropathy. *Pediatr Res*..1996; 40 (4): 620-626.
- 14- Dilena A, Penberthy A, Fraser G. Six Methods for determining urinary protein compared . *Clin. Chem*. 1983; 29 ;1533-1557.
- 15- Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: Theory and practice*. 3rd edition, Bath Press. 1999; 229-231.
- 16- Gundersen HJG, Bagger P. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96: 857-881.
- 17- Howard CV, Reed MG. *Unbiased stereology three-dimensional measurement in microscopy*. BIOS Scientific Publishers.1998; 1-106,151-176.
- 18- Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J AM Soc NEPH*. 1999; 10(5): 1100-20.
- 19- Kukner A, Colakoglu N, Ozogul C, Naziroglu M, Firat T. The effects of combined vitamin C and E in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *J Afr Stud Dev*. 2009;1(2): 029-036.
- 20- Alsaad KO, Herzenberg AM. Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: An update. *J. Clin. Pathol*. 2007; 60: 18-26.
- 21- Sungil K, Dong C, Han H. Lovastatin inhibits transforming growth factor-1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2000;1: 80-87.
- 22- Jandeleit DK, Caoz AJ, Kelly DJ. Role of hyperlipidemia in progressive renal disease: focus on diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 1999; 71: 531-6
- 23- Kim SS, Gallaher DD, Csallany AS. Vitamin E and probucol reduce urinary lipophilic aldehydes and renal enlargement in streptozotocin-induced diabetic rats. *Lipids*. 2000; 35(11): 1225-37
- 24- Craven PA, Derubertis FR, Kagan VE, Melhem M and Studer RK. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8: 1405-1414
- 25- Singh RB, Singh NK, Rastogi SS, Wander GS, Aslam M, Onouchi Z et al. Antioxidant effects of lovastatin and vitamin E on experimental atherosclerosis in rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther*.1997; 11: 575-580

The effect of lovastatin and vitamin E on glomerular volume in diabetic rats

A.A. Rajabzadeh¹, A.R. Ebrahimzadeh Bideskan², J. Hami³, A.R. Rajabzadeh⁴, E. Serki⁵

Background and Aim: Diabetic nephropathy is the most common complication of diabetes. Oxidative stress has been suggested to play a key role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. It has been shown that vitamin E and lovastatin delay the onset and progression of nephropathy. The purpose of this study was to determine the effects of supplementation of vitamin E and lovastatin on glomerular volume in diabetic rat kidney.

Materials and Methods: Forty male Wistar rats were randomly divided into five groups. Group 1 was considered as control group and groups 2-5 as experimental groups in which diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg). Sixty days after induction of diabetes, the rats of group 3, 4 and 5 were received lovastatin (10 mg/kg/day), vitamin E (100 IU/kg), and simultaneously lovastatin and vitamin E, respectively. After treatment, the rats were anesthetized and then the kidneys were excised and fixed. Following tissue processing and staining, glomerular and kidney volume were estimated by cavalieri method.

Results: Total glomerular volume was increased significantly in the diabetic group (group 2) in comparison with the control group ($P < 0.01$). The lovastatin group (group 3) showed a significant decrease in total glomerular volume in comparison with the diabetic group ($p < 0.01$). However, in the vitamin E group (group 4), total glomerular volume decreased much more than in the lovastatin group and the lovastatin and vitamin E (group 5) simultaneously ($P < 0.001$).

Conclusion: It is possible that administration of lovastatin and vitamin E has renal protective effects on diabetic rats and ameliorates renal function and also prevents structural changes in an experimental model of diabetic nephropathy.

Key Words: Diabetic nephropathy, Glomerular volume, Vitamin E, Lovastatin.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2011; 17(3): 159- 167

Received: November 20, 2010 Accepted: June 15, 2011

¹Corresponding Author; PhD Candidate of Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences and Cellular Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Rajabzadeh86@gmail.com

² Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences and Cellular Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ PhD Candidate of Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences and Cellular Biology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

⁴ M.Sc Candidate of Developmental and Cellular Biology, Department of Biology, School of Science, Tarbiat Moaalem University

⁵ M.Sc Candidate of Biochemistry, Department of Biochemistry, School of Science, Ferdowsi University of Mashhad