مقاله اصیل پژوهشی

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

زهرا قیروانی[1]، محمود زردست[2]، محمد حسن پور فرد[3]، مهران حسینی[4]

چکیده

زمینه و هدف: همزمان با افزایش اقبال عموم به مصرف گیاهان دارویی، انجام تحقیقات علمی به‌منظور ارزیابی کارآیی و اثرات سوء احتمالی این ترکیبات، ضرورت پیدا کرده است. در مطالعات اخیر، تیغه میانی گردو به‌عنوان ترکیبی با خواص کاهنده قند خون معرفی شده است؛ بنابراین پژوهش حاضر به‌منظور ارزیابی اثرات مصرف آن بر عملکرد بیوشیمیایی و تغییرات پاتولوژیک بافت کلیه در موش‌های 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. گروه‌های I و II دیابتیک به‌ترتیب: با غلظت‌های 400 و 200mg/kg عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو، گروه III دیابتیک با داروی متفورمین (50mg/kg) و گروه‌های IV دیابتیک و کنترل سالم با نرمال‌سالین، روزانه به‌مدت 4هفته به‌صورت خوراکی تیمار شدند. در پایان، اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی شامل: قند خون، پروتئین ادرار 24ساعته، کراتینین و نیتروژن اوره خون و همچنین تغییرات کمی و کیفی آسیب‌شناسی کلیه (1200 گلومرول) در تمام گروه‌ها انجام گرفت و مقادیر آنها در بین گروه‌ها مقایسه گردید.

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

نتیجه‌گیری: مصرف تیغه میانی گردو، می‌تواند اثرات سودمندی بر عملکرد کلیوی رت‌های دیابتیک داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: نفروپاتی دیابتی؛ گیاهان دارویی؛ تیغه میانی گردو؛ رت

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

دریافت: 1394/03/22 **پذیرش: 1394/06/07**

[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 به‌شکل کنترل‌نشده‌ای افزایش می‌یابد (1). عدم مهار افزایش قند خون سبب آسیب به قسمت‌های مختلف بدن از جمله اعصاب و عروق خونی می‌شود (2). بیش از یک‌سوم مبتلایان به دیابت، در دوران ابتلا به این بیماری عوارض عصبی و عروقی به‌خصوص رتینوپاتی و نفروپاتی را تجربه می‌کنند (3). نفروپاتی دیابتی، عامل 14درصد مرگ و میر ناشی از بیماری دیابت و 40درصد نارسایی‌های کلیوی شناخته شده است (4، 5). دیابت، با ایجاد تغییرات هم در بخش گلومرولی و هم در بخش توبولی کلیه‌ها، سبب ایجاد نفروپاتی می‌شود (6). از مهمترین آسیب‌های نفروپاتی دیابتی در بخش گلومرولی کلیه می‌توان به اسکلروزیس، انتشار ماتریکس‌مزانشیال و ضخیم‌شدگی غشای پایه اشاره کرد (7). نفروپاتی با نشانه‌هایی چون: افزایش آلبومین ادرار، پرفشاری خون، ادم و کاهش پیشرونده فیلتراسیون گلومرولی 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 ازجمله 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 40درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (16). پس از تبخیر کامل حلال، پودر باقی‌مانده در ظرف‌ها برداشته شد. در این روش عصاره‌گیری، به‌ازای هر 100گرم پودر تیغه میانی گردو، 5گرم عصاره هیدروالکلی

به‌دست آمد.

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در دامنه وزنی 180-160گرم استفاده گردید. برای ایجاد نفروپاتی دیابتی در رت‌ها، پس از یک شب ناشتایی، یک دوز محلول آلوکسان مونوهیدرات 150mg/Kg به‌صورت درون‌صفاقی تزریق شد (17). پس از دو هفته، رت‌های با قند خون ناشتای بالای 350mg/dl، به‌عنوان رت‌های مبتلا به دیابت حاد در نظر گرفته شدند (18). برای پیشرفت عوارض دیابت و همچنین سازگارشدن حیوانات با محیط آزمایشگاه ، حیوانات به‌مدت 4هفته بدون انجام مداخله در شرایط کنترل‌شده (دمای 25-21 درجه سانتی‌گراد و چرخه نور/روشنایی 12ساعته)، 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، به‌طور 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. 32موش دیابتیک و 8موش سالم، در پنج گروه مساوی قرار گرفتند. گروه‌های I و II دیابتیک به‌ترتیب: با دوزهای 200mg/kg و 400mg/kg عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو به‌صورت روزانه، گاواژ شدند. گروه III دیابتیک نیز به‌عنوان گروه کنترل مثبت، روزانه 50mg/kg متفورمین دریافت نمود (19). گروه IV کنترل دیابتیک (DC) و گروه کنترل سالم (NC)، روزانه، هم‌حجم مقدار گاواژ سایر گروه‌ها (1میلی‌لیتر)، نرمال‌سالین دریافت نمودند. آلوکسان مونوهیدرات، محصول شرکت سیگما آلدریچ 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 0/9درصد استفاده گردید.

در روز بیست و نهم مداخله، تمام موش‌ها، در قفس‌های متابولیک قرار داده شدند تا نمونه 24ساعته ادرار آنها برای اندازه‌گیری پروتئین گرفته شود. در روز سی‌ام، ضمن رعایت شرایط ناشتای 14ساعته، 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، کلّیه راست موش‌ها برداشته شد و پس از توزین، برای انجام پروسه پاساژ بافتی، در محلول فیکساتیو بافر فرمالین 10درصد 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 حدّاکثر 5میکرومتر 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 10فیلد میکروسکوپی به‌وسیله میکروسکوپ نوری (UPlanFI, Japan) مشاهده شد و تصاویر، توسط دوربین دیجیتال (BX51, Japan) کالیبره‌شده توسط لام هموسیتومتر متصل به میکروسکوپ، تهیه گردید. در مجموع 1200گلومرول توسط نرم‌افزار آنالیز تصاویر میکروسکوپی (Image J 1.44p; National inistitute of Health, USA) مورد اندازه‌گیری کمی قرار گرفت. به‌طور خلاصه پارامترهای کمی شامل ؛درصد انتشار ماتریکس مزانشیال نسبت به کل کلافه گلومرولی (با اندازه گیری مساحت ناحیه PAS مثبت درون کلافه گلومرولی و کم کردن آن از مساحت کل کلافه گلومرولی) ، اندازه فضای کل گلومرولی

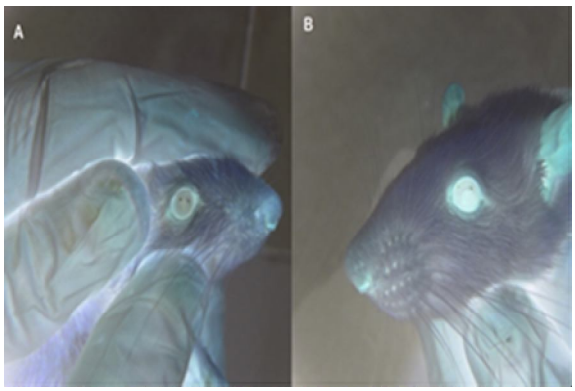
[1] *Periodic acid Schiff*

(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 شدگی کپسول بومن، هیالینیزاسیون، گشاد شدگی مویرگهای گلومرول ها و اسکلروزیس بصورت وجود دارد/ ندارد (1و0) در چک لیست ارزیابی هر گلومرول مد نظر قرار گرفت (20).

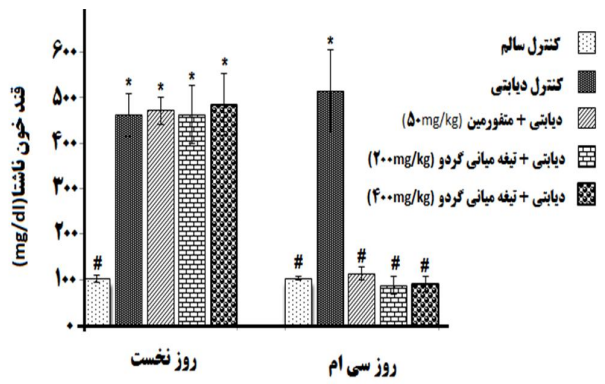
داده‌ها پس از جمع‌آوری، در نرم‌افزار SPSS (ویرایش 15) وارد گردید و توسط آمار توصیفی برای گروه‌ها به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار و آمار تحلیلی و مقایسه‌ای با استفاده از آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی توکی، با اطمینان 95%، مورد آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها

مقایسه مقادیر قند خون موش‌ها قبل از شروع آزمایش نشان داد که گروه‌های دیابتیک، قند خون حدود 4/5برابر گروه کنترل سالم داشتند ($p\leq0/0001$). در طول طرح نیز موش‌های گروه کنترل دیابتیک که به دیابت شدید مبتلا بودند، علایم ظاهری آسیب چشمی (کاتاراکت دیابتی) را نشان دادند (شکل 1) که خود مؤیّد پیشرفت عوارض ناشی از هایپرگلایسمی در این حیوانات بود. در طول انجام پژوهش، یکی از موش‌های گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو (400mg/kg)، حدود 2ساعت پس از گاواژ به‌علّت کاهش شدید قند خون (43mg/dl) و به‌دنبال بروز علایم هیپوگلایسمی 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 بین‌گروهی 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 ($p\leq0/0001$). مقایسه بین‌گروهی 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 ($p\leq0/0001$).



شکل 1- عوارض میکروآنژیوپاتی ناشی از دیابت پس از یک مرحله هایپرگلایسمی 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).



**نمودار 1- مقایسه بین‌گروهی میانگین±انحراف‌معیار قند خون قبل و بعد از تیمار. ***تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم، # تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک.

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 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 10هفته (6 هفته قبل از شروع مطالعه و 4هفته پس از آن) در مقایسه با موش های گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری ($p\leq0/0001$) مقادیر پروتئین ادرار، نیتروژن اوره و کراتینین خون بالاتری داشتند. عصاره هیدروالکلی تیغه میانی گردو در هر دو دوز توانست به‌طور مؤثّری 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.

جدول 1- مقایسه میانگین±انحراف‌معیار 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 ادرار24 ساعته (میلی‌لیتر)
کنترل سالم	249/50±11/64#	0/0039±0/00038#	8/16±2/03#
کنترل دیابتی	144/37±9/03 **	0/0062±0/00081 **	57/3±20/12**
دیابتی+ متفورمین (50mg/kg)	177/37±30/47*#	0/0041±0/00051 *#	23/50±2/56**#
دیابتی+تیغه میانی گردو (200mg/kg)	195/62±27/82 *#	0/0040±0/00065#	8/53±2/57 #
دیابتی+تیغه میانی گردو (400mg/kg)	206/00± 8/86 *#	0/0037±0/0010#	8/75±3/04#

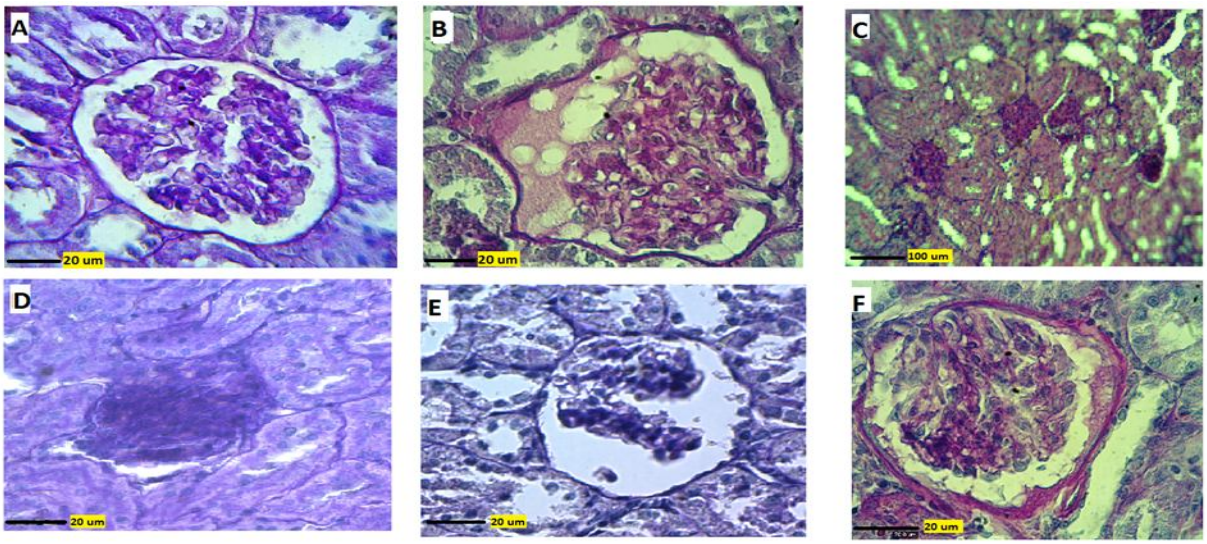
* تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم. ** تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم.
# تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک

جدول 2- مقایسه میانگین±انحراف‌معیار 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±0/87 #	12/9±1/7#	0/92±0/03 #
کنترل دیابتی	48/12±4/32 **	34/20±6/21 **	2/28±0/ 34 **
دیابتی+متفورمین (50mg/kg)	35/25±4/02#**	29/50±4/53 **	1/65 ± 0/28 **#
دیابتی+تیغه میانی گردو (200mg/kg)	24/50±3/54#*	14/26±/73#	1/31±0/24*#
دیابتی+تیغه میانی گردو (400mg/kg)	15/25±2/37#*	14/17±1/6#	1/36±0/05*#

* تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم. ** تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم.
# تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل دیابتیک

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



شکل 2- تصاویر بافتی ضایعات نفروپاتی دیابتی مشاهده‌شده در گروه‌های مورد مطالعه. بزرگنمایی 400X (به‌جز C)، رنگ‌آمیزی PAS A) گلومرول طبیعی، B) هیالینیزاسیون، انتشار ماتریکس مزانشیال، گشادشدگی مویرگ‌های گلومرولی و چسبندگی کلافه گلومرولی به کپسول بومن در گروه دیابتیک، C) گلومرول اسکلروزیس گروه دیابتیک بزرگنمایی 100X، D) گلومرول اسکلروزیس و هایپرسلولاریتی گروه دیابتیک، E) افزایش فضای ادراری در گروه دیابتیک، F) ضخیم‌شدگی کپسول بومن در گروه دیابتیک.

جدول 3- مقایسه کمی تغییرات بافتی در بین گروه های مورد مطالعه

گروه‌ها	اندازه فضای گلومرولی (میکرومتر مربع)	انتشار ماتریکس مزانشیال (درصد)	چسبندگی کلافه گلومرولی 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 گلومرول اندازه‌گیری‌شده برای هر گروه 240 گلومرول. *تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/05$) در مقایسه با گروه کنترل سالم، ** تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) در مقایسه با گروه کنترل سالم، # تفاوت معنی‌دار ($p\leq0/0001$) 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 به‌عنوان یک ترکیب با خواص آنتی‌دیابتیک شناخته شده است، مورد ارزیابی قرار گرفت. محققان این مطالعه، با بررسی ابعاد مختلف علایم کلینیکی ناشی از دیابت، به‌دنبال بررسی اثرات عصاره تیغه میانی گردو بر تمام این پارامترها بودند. یافته‌های این مطالعه به‌وضوح نشان داد که تغییرات ظاهری، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و پاتولوژیک مشاهده شده، مؤیّد ایجاد عوارض دیابت از جمله نفروپاتی دیابتی در موش‌ها بود. مصرف 4هفته‌ای عصاره هیدرو الکلی تیغه میانی گردو در هر دو دوز توانست به‌خوبی 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 بزرگ‌شدگی گلومرول‌ها را در موش‌ها مهار کند. این ترکیب همچنین مانع بروز برخی تغییرات کیفی پاتولوژیک ارزیابی‌شده 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 به‌طور معنی‌داری مهار نمود، اما نتوانست مقادیر آنها را در دامنه طبیعی نگهدارد.

این مطالعه برای اولین‌بار اثرات مربوط به عملکرد کلیوی مصرف عصاره تیغه میانی گردو را در رت‌های دیابتی‌شده با آلوکسان از منظر بیوشیمیایی و پاتولوژیک و به‌صورت کمّی مورد ارزیابی قرار داد. اثرات کاهنده قند خون مشاهده‌شده 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم در مدت‌زمان 14روز، اثرات هیپوگلایسمیک را در رت‌های دیابتی‌شده 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 دیابتی‌شده با استرپتوزوسین در دوزهای 200، 400، 600 و 800 میلی‌گرم بر کیلوگرم، اثرات کاهنده قندخون غیر وابسته به دوز را نشان داد. اما مطالعه بافت‌شناسی سلول‌های پانکراس، تغییری را در راستای ترمیم سلول‌های بتای تخریب‌شده (مکانیسم اثر داروهای القاکننده دیابت می‌باشد) نشان نداد (14). با توجه به مطالعات یاد شده و نتایج مطالعه پیش‌رو می‌توان به دو نکته سودمندبودن عصاره تیغه میانی گردو در کاهش قند خون و همچنین مکانیسم کاهش قند خون غیر وابسته به هورمون انسولین و دوز عصاره را مدّ نظر قرار داد.

امروزه به‌دلیل اینکه درمان قطعی برای امراض مزمن کلیوی نظیر نفروپاتی دیابتی وجود ندارد، غالباً بیماران به‌دنبال درمان‌های غیر متعارف نظیر استفاده از گیاهان دارویی هستند. در حالی‌که 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 کارآیی، اثرات سوء احتمالی و حتی سمیّت گیاهان دارویی وجود دارد که این امر، ضرورت انجام تحقیقات علمی و بررسی اثرات گوناگون مصرف این ترکیبات را ایجاد کرده است (21). به‌طور کلی یافته‌های اخیر در خصوص مکانیسم‌های اثر گیاهان دارویی در درمان امراض کلیوی از جمله نفروپاتی دیابتی حول محورهای چون خواص: ضدّ التهابی، آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌فیبروتیک و تنظیم‌کننده سیستم ایمنی

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 به‌دلیل داشتن ترکیبات پلی‌فنولیک، فلاونوئید و ... دارای خواص آنتی‌اکسیدان و همچنین ضدّ التهاب می‌باشند (23).

فیبروز کلیوی به‌عنوان آخرین مرحله بیماری مزمن کلیوی مطرح می‌باشد. ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌فیبروتیک، به‌عنوان بهترین مداخله در درمان بیماری‌های کلیوی از جمله نفروپاتی دیابتی مطرح می‌باشند. یافته‌های اخیر نشان دادند که بسیاری از ترکیبات مؤثّره گیاهی، خواص آنتی‌فیبروتیک دارند. از جمله در یکی از تحقیات نشان داده شد که مصرف عصاره غنی از پلی‌فنول پوست میوه گردو در رت‌ها توانسته است آسیب بافتی کبدی (فیبروز) 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 آنتی فیبروتیک تیغه میانی باید بیش از پوست میوه گردو باشد.

در پاتوژنز نفروپاتی دیابتی، با تحریک‌شدن سیستم ایمنی، برخی سیتوکین‌ها نظیر: فاکتور تغییردهنده رشد بتا[1]، فاکتور نکروزکننده تومر آلفا[2] و بسیاری دیگر از کینازها نظیر پروتئین کیناز C [3] افزایش یافته و باعث تغییر رفتار سلولی که غالباً مرگ سلولی را به‌دنبال دارند، می‌شود (25). در طب سنتی برای درمان مراحل اولیه بیماری‌های کلیوی، از ترکیبات دارای خواص سرکوبگر سیستم ایمنی استفاده می‌شود. مصرف این ترکیبات حتی به‌دنبال عمل پیوند کلیه به‌منظور 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 مؤثّره نزدیک به این گیاه نظیر سیر دارای خواص ضدّ 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 به‌عنوان ترکیبی با خواص کاهنده قند خون و جلوگیری‌کننده از پیشرفت نفروپاتی دیابتی معرفی نمود . احتمال می رود این اثرات وابسته به وجود ترکیبات مؤثّره 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 مدّت‌زمان کوتاه مداخله و عدم اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی مرتبط با نفروپاتی دیابتی در آغاز مطالعه اشاره نمود که پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده مدّ 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

[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 پویان، پژوهشگر پیشکسوت گیاهان دارویی جنوب خراسان، بدلیل ارائه راهنمایی و کمک در تایید گیاه شناسی گردو و دریافت کد هرباریوم تشکر و قدردانی می گردد.

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, Ponnamperuma 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. Vascul 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 Ghiravani[1], Mahmoud Zardast[2], Mohammad Hassanpour-Fard[3], Mehran Hosseini[4]

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 fallow; 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. Finaly, fasting blood glucose (FBG), 24h urine total protein (UTP), blood nitrogen urea (BUN) and plasma cratinine (Cr) were assessed biochemically and also quantitative and qualitative renal histopathological altrations for 1200 glomerulus were determined patologically.

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*