Original Paper

Effect of chronic administration of Silymarin on oxidative stress markers in renal tissue of diabetic Rats

Roghani M (PhD)[1], Baluchnejadmojarad T (PhD)*[2], Roghani Dehkordi F (MD)[3]

[1]Professor, Neurophysiology Research Center, Department of Physiology, Shahed University, Tehran, Iran. [2]Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medcial Sciences, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Cardiology and Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medcial Sciences, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objective: Chronic diabetes mellitus is accompanied with enhanced oxidative stress and reduce the activity of antioxidant defense system. Due to significant role of enhanced oxidative stress in development of renal damage in diabetices, this study was conducted to evaluate the effect of chronic administration of Silymarin on oxidative stress markers in renal tissue of diabetic rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats were divided into 5 groups: control, silymarin-treated control (100 mg/kg bw), diabetic, and silymarin -treated diabetic groups (50 and 100 mg/kg bw). Silymarin was administered (daily and intraperitonealy) ten days after Streptozotocin injection for 4 weeks. Tissue level of malondialdehyde and nitrite and nitrate and activity of superoxide dismutase in kidney tissue were measured. Data were analyzed using ANOVA and Tukey tests.

Results: A significant increase in tissue level of malondialdehyde, nitrite and nitrate in diabetic rats were observed ($P<0.05$). Silymarin treatment (100 mg/kg/bw) significantly reduced the tissue level of Malondialdehyde, nitrate and nitrate ($P<0.05$). Non-significant recduction of activity of superoxide dismutase was oberved in diabetic rats and Silymarin treatment (50 and 100 mg/kg bw) did not significantly altered enzyme activity.

Conclusion: Four weeks treatment of Silymarin (100 mg/kg bw) reduce oxidative stress indexes in renal tissue of diabetic rats.

Keywords: Silymarin, Diabetes mellitus, Kidney, Oxidative stress, Malondialdehyde, Superoxide dismutase

*** Corresponding Author: Baluchnejadmojarad T (PhD), E-mail: tmojarad@yahoo.com**

Received 9 May 2011 **Revised** 13 August 2011 **Accepted** 19 October 2011

This paper should be cited as: Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Roghani Dehkordi F. [Effect of chronic administration of Silymarin on oxidative stress markers in renal tissue of diabetic Rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(2): 10-16. [Article in Persian]

تحقیقی

اثر تجویز دراز مدت سیلی مارین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو بافت کلیه موش صحرایی نر دیابتی

دکتر مهرداد روغنی[1]، دکتر توراندخت بلوچ نژاد مجرد*[2]، دکتر فرشاد روغنی دهکردی[3]

۱- استاد مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشگاه شاهد. ۲- استاد گروه فیزیولوژی ، دانشکده پزشکی (پردیس همت)، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
۳- دانشیار گروه قلب و عروق ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

چکیده

زمینه و هدف : *دیابت قندی موجب افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی می‌شود. با توجه به اهمیت تشدید استرس اکسیداتیو در بروز آسیب کلیوی در بیماری دیابت، این مطالعه به منظور ارزیابی اثر تجویز دراز مدت سیلی مارین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو بافت کلیه موش صحرایی دیابتی انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ٤٠ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰-۲٤۰ گرم انجام شد. موش‌ها به پنج گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با سیلی‌مارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، دیابتی و دو گروه دیابتی تحت درمان با سیلی‌مارین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) تقسیم شدند. سیلی‌مارین ۱۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین به مدت ٤ هفته (داخل صفاقی و روزانه) تجویز شد. سطح مالون‌دی‌آلدئید، نیتریت، نیترات و فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز در بافت کلیه اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های ANOVA و توکی تجزیه و تحلیل شدند.*

یافته‌ها : *افزایش معنی‌داری در سطح بافتی مالون‌دی‌آلدئید، نیتریت و نیترات در موش‌های دیابتی مشاهده شد ($P<0/05$). درمان با سیلی‌مارین در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم میزان آنها را به صورت معنی‌داری کاهش داد ($P<0/05$). به علاوه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز در موش‌های دیابتی به‌طور غیرمعنی‌دار کاهش یافت و درمان با سیلی‌مارین در هیچکدام از دوزها (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) موجب افزایش معنی‌دار آن نشد.*

نتیجه‌گیری : *تجویز چهارهفته‌ای سیلی‌مارین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کلیه در موش‌های دیابتی گردید.*

کلید واژه‌ها : *سیلی مارین ، دیابت قندی ، کلیه ، استرس اکسیداتیو ، مالون دی آلدئید ، سوپر اکسید دیس موتاز*

* نویسنده مسؤول : دکتر توراندخت بلوچ نژاد مجرد ، پست الکترونیکی tmojarad@yahoo.com

نشانی : تهران، بزرگراه همت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پردیس همت، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی ، تلفن ۸۲۹۴۴۵۷۷ – ۰۲۱ ، نمابر ۸۸۶۲۲۷۰۹

وصول مقاله : ۹۰/۲/۱۹ ، اصلاح نهایی : ۹۰/۵/۲۲ ، پذیرش مقاله : ۹۰/۷/۲۷

مقدمه

دیابت قندی از نظر بالینی یکی از مهم‌ترین عوامل خطر برای اختلالات دیگر نظیر نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی - عروقی محسوب می‌شود که براساس پیش‌بینی به‌عمل آمده؛ شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش خواهد یافت (۳-۱). دیابت قندی ارتباط گسترده و نزدیکی با استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد. افزایش قندخون با افزایش استرس اکسیداتیو همراه می‌باشد و خود این بسیاری از عوارض بیماری را در بافت‌های مختلف به‌دنبال دارد (۶-۴). تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مهمی در آسیب بافت کلیه در افراد دیابتی دارد (۶). از نظر بیوشیمیایی، از جمله شاخص‌های مهم استرس اکسیداتیو، افزایش سطح بافتی مالون‌دی‌آلدئید، نیتریت، نیترات و کاهش فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی نظیر سوپراکسید دیس‌موتاز می‌باشد (۶و۷). کاهش این تغییرات در حالت دیابت قندی با استفاده از مواد مؤثره گیاهی با خاصیت ضددیابتی و آنتی‌اکسیدانتی از اهمیت بالینی زیادی برخوردار است (۳). در این خصوص، سیلی‌مارین به‌عنوان مهم‌ترین ماده مؤثر گیاه ماریتیغال یا خارمریم با نام علمی *Silybum marianum* می‌باشد که از گروهی از مواد شیمیایی به نام فلاوونولیگنان‌ها تشکیل شده است (۸). سیلی‌مارین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانتی قابل توجه بوده و سبب کاهش رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها و

افزایش فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز در اریتروسیت‌ها می‌شود. به‌علاوه دارای اثرات ضدالتهابی بوده و سبب مقاومت در برابر تخلیه ذخایر گلوتاتیون شده و به هنگام آسیب پارانشیم کبد، سنتز پروتئین توسط هپاتوسیت‌ها را افزایش می‌دهد (۹و۱۰). در چندین مطالعه اثربخشی آن در درمان بیماری کبد الکلی مزمن، سیروز، کبد چرب و هپاتیت‌های ویروسی با ارزیابی مارکرهای متابولیک، بالینی و بافت‌شناسی نشان داده شده است (۱۱). همچنین سیلی‌مارین دارای اثرات کاهش‌دهندگی کلسترول و قندخون، ضدسرطان‌زایی و تعدیل‌کنندگی ایمنی می‌باشد (۱۲و۱۳). به‌نحوی که سیلی‌مارین به میزان قابل توجهی جذب کلسترول را کاهش می‌دهد و به تبع آن سبب کاهش مقادیر کلسترول و LDL خون می‌شود و موجب افزایش چشمگیر کلسترول HDL خون می‌گردد (۱۴). همچنین خاصیت ضددیابتی سیلی‌مارین در بیماران دیابتی نوع ۲ و در مدل تجربی دیابت قندی در چند سال اخیر مورد تائید قرار گرفته است (۱۷-۱۵). این مطالعه به منظور ارزیابی اثر تجویز سیلی‌مارین بر سطح بافتی برخی مارکرهای استرس اکسیداتیو بافت کلیه موش‌های صحرایی دیابتی انجام گردید.

روش بررسی

حیوانات

این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰-۲۴۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور تهران در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تهران انجام شد.

حیوانات در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. حیوانات آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس، کرج) به مدت ۶ هفته دسترسی داشتند. این مطالعه براساس دستورالعمل‌های توصیه شده انستیتو ملی بهداشت آمریکا (NIH) برای نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و راهکارهای عملی موجود در داخل کشور به انجام رسید. از موش‌های صحرایی نری که در شرایط طبیعی و در حالت روزه‌داری (به مدت یک شب)، میزان گلوکز سرم آنها کمتر از ۱۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود؛ استفاده شد. در این خصوص از شبکه رتروارتال و لوله موئینه برای خونگیری استفاده شد. حجم خون اخذ شده از هر حیوان حدود یک میلی‌لیتر بود. موش‌ها به طور تصادفی در پنج گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با سیلی مارین (سیگما، آلمان) (۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با سیلی مارین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) قرار داده شدند. دوز سیلی‌مارین براساس آزمایشات پیلوت و منابع موجود انتخاب شد (۱۸). سیلی‌مارین ۱۰ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین به مدت ۴ هفته (داخل صفاقی و روزانه) تجویز شد. برای دیابتی نمودن موش‌ها از داروی استرپتوزوتوسین (سیگما، آمریکا) به صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد. یک هفته پس از تزریق، برای اطمینان از دیابتی بودن حیوانات، قند ادرار به روش نوار ادراری (شرکت گلوکو یاب، تهران) کنترل شد و فقط حیوانات دیابتی با میزان قند ادرار بالاتر از ۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر که با میزان قندخون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر با در نظر گرفتن آستانه فیزیولوژیک ظهور قند در ادرار برابری می‌کند؛ به مرحله بعدی برای شروع تیمار راه‌یافتند. تعیین میزان وزن حیوانات قبل از انجام کار و در طی هفته‌های ۳ و ۶ پس از بررسی به انجام رسید. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران) با استفاده از اسپکتروفتومتر (اسپکترونیک ۲۰، آمریکا) انجام شد.

سنجش مالون دی آلدئید بافتی

پس از پایان کار، حیوان با اتر بیهوش و با روش یوتنزی کشته شد. بافت کلیه از بدن جدا شد و پس از شستشو با محلول سالین سرد و خشک نمودن سریعاً توزین شد و سپس بافت‌ها جداگانه به همراه بافر تریس به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایزر با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه (۱۰ درصد) شدند و محلول هموژنیزه شده، سانتریفوژ شد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تمامی مراحل گفته شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا شد، بخش زیرین رسوب کرده دور ریخته شد و از محلول شفاف رویی برای سنجش استفاده گردید. اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدئید MDA براساس روشی بود که اساس آن واکنش تیوباربیتوریک اسید TBA می‌باشد و در دمای جوش انجام می‌گیرد. در این آزمایش مالون‌دی‌آلدهید یا مواد شبه‌مالون دی‌آلدئید با تیوباربیتوریک اسید واکنش داده و رنگ صورتی ایجاد نموده که ماکزیمم جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر است. این واکنش در pH ۲ تا ۳ و در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. بعد از سرد کردن نمونه، جذب نوری خوانده شد. برای این کار از نمونه‌های سانتریفوژ شده به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر برداشته و به ۱/۵ cc تری‌کلرو استیک اسید و ۱/۵ cc از TBARS اضافه شد و تمامی نمونه‌ها و لوله‌های استاندارد با رقت‌های مختلف را به مدت ۸۰ دقیقه در بن‌ماری آب جوش قرار دادیم تا واکنش صورت گیرد. سپس محلول‌ها در دور ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و جذب نوری آنها در طول موج ۵۳۲ nm در دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. منحنی استاندارد براساس رقت‌های تترا اتوکسی پروپان تهیه شد و جذب‌های نوری به دست آمده از نمونه‌ها روی منحنی استاندارد تطبیق داده شد (۱۹).

سنجش نیتریت و نیترات بافتی

سنجش میزان نیتریک اکساید بافت کلیه به‌طور غیرمستقیم براساس واکنش گریس انجام شد (۱۹). به دلیل مشکل بودن سنجش مستقیم نیتریک اکساید در بافت‌های زنده؛ میزان نیتریت و نیترات به عنوان شاخصی برای نیتریک اکساید محسوب می‌شود. محلول کاری شامل سولفانیل آمید ۱درصد، نفتیلن اتیلن دی‌آمیددی‌هیدروکلرید ۰/۱ درصد و ارتوفسفریک اسید ۲/۵درصد بود. برای سنجش آن یک میلی‌لیتر از ازبافت هموژنیزه و یک میلی‌لیتر از محلول گریس استفاده شد. مخلوط این دو به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق نگهداری شد و جذب نوری آن در طول موج نوری ۵۴۰ نانو متر خوانده شد و برای منحنی استاندارد از رقت‌های مختلف نیتریت سدیم استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

اساس این اندازه‌گیری برمهار احیا نیتروبلوتترازولیوم توسط سیستم گزانتین–گزانتین اکسیداز به عنوان تولید کننده سوپراکسید بود. در این آزمایش از محلول کاری شامل گزانتین،گزانتین اکسیداز در بافر پتاسیم فسفات و نیتروبلوتترازولیوم استفاده شد. جذب نوری هر نمونه به مدت ۵ دقیقه هر ۳۰ ثانیه یکبار خوانده شد. برای به‌دست آوردن درصد مهار انجام شده توسط آنزیم SOD، داده‌های به‌دست آمده از فرمول مربوطه براساس دستورالعمل کیت استفاده شد. با انطباق درصد مهار روی منحنی استاندارد، فعالیت آنزیم به‌دست آمد و فعالیت آن برحسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (۱۹).

سنجش پروتئین

سنجش پروتئین به روش برادفورد انجام شد (۱۹). در این روش ابتدا معرف مربوطه تهیه گردید. این معرف به این صورت تهیه شد که ۲۵ میلی‌گرم کوماسی بلو در ۱۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵درصد حل شد. سپس ۲۵ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۸۵درصد اضافه شد. هنگامی که رنگ حل شد؛ حجم آن به یک لیتر رسانده شد و با کاغذ صافی صاف گردید. معرف باید رنگ قهوه‌ای روشن داشته باشد. همچنین غلظت‌های استاندارد تهیه شد که برای تهیه محلول استاندارد از آلبومین سرم گاوی استفاده شد. برای سنجش غلظت پروتئین در نمونه‌های بافتی، از هرنمونه ، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به ۵میلی‌لیتر از معرف تهیه شده به آن اضافه شد. همچنین از غلظت‌های استاندارد ۱۲/۵ ، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ تهیه شده نیز ۱۰۰میکرولیتر برداشته شد و به ۵ میلی‌لیتر از معرف اضافه شد. تمامی محلول‌ها ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس جذب نوری آنها در طول موج ۵۹۵ nm خوانده شد. در نهایت غلظت پروتئین در نمونه‌ها با استفاده از انطباق مقادیر جذب‌های نوری به دست آمده از نمونه‌ها روی منحنی استاندارد به دست آمد.

از نظر آماری تمامی نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان گردید. پس از مشخص نمودن توزیع داده‌ها، برای مقایسه نتایج هر متغیر در هر یک از گروه‌ها قبل و بعد از بررسی از ANOVA با اندازه‌گیری مکرر و برای مقایسه گروه‌ها با هم در هر یک از پریودهای زمانی از ANOVA یک‌طرفه و پست تست توکی استفاده گردید. به‌علاوه سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ برای تمامی آنالیزها در نظر گرفته شد.

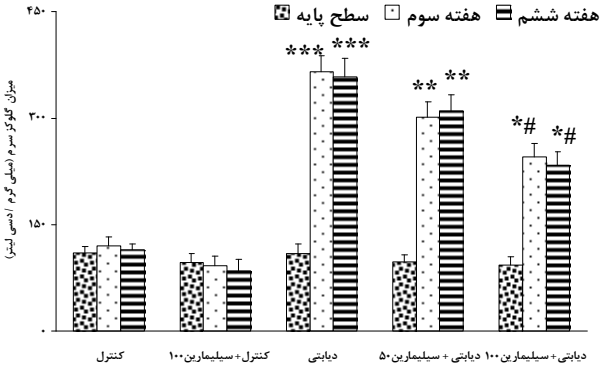
یافته‌ها

از نظر وزن، هیچگونه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در هفته قبل کار (سطح پایه) مشاهده نشد. گروه کنترل تحت تیمار با سیلی مارین در حد کمتر از گروه کنترل، یک افزایش طبیعی در وزن را در پایان هفته ششم نشان داد. در گروه دیابتی در هفته ششم یک کاهش معنی‌دار در مقایسه با هفته قبل بررسی ($P<0/05$) مشاهده گردید. همین وضعیت در مورد گروه دیابتی دریافت کننده سیلی مارین به میزان ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز وجود داشت. از طرف دیگر کاهش وزن در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای سیلی مارین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه دیابتی در هفته ششم به صورت معنی‌داری کمتر بود ($P<0/05$) (نمودار یک).

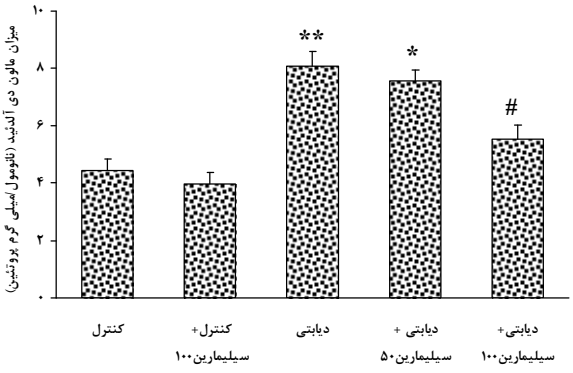
نمودار ۱ :تغییرات وزن در هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی مارین
**** $P<0/05$ در در مقایسه با سطح پایه در همان گروه***

در خصوص میزان گلوکز سرم، قبل از مطالعه تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها یافت نشد. در هفته ششم میزان گلوکز سرم در گروه دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیلی مارین در حد معنی‌دار ($P<0/0005$ تا $P<0/01$) بیشتر از گروه کنترل بود. هر چند با افزایش دوز سیلی مارین، این افزایش میزان گلوکز سرم تخفیف یافت. به‌علاوه در گروه دیابتی تحت درمان با دوز بالای سیلی مارین، میزان گلوکز سرم در هفته ششم به طور معنی‌داری کمتر از گروه دیابتی درمان نشده بود ($P<0/01$). به علاوه گروه کنترل

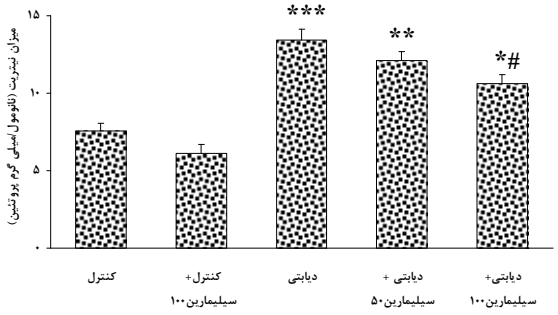
تحت تیمار با سیلی مارین کاهش معنی‌دار این متغیر را در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد (نمودار ۲).



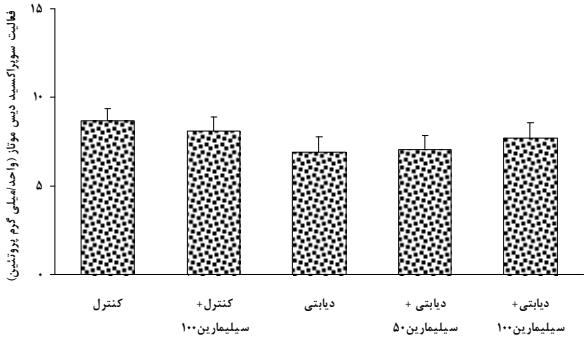
نمودار ۲ : تغییرات گلوکز سرم در هفته‌های مختلف در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین
**** P<۰/۰۱ ، ** P<۰/۰۰۵ ، *** P<۰/۰۰۰۵ (در مقایسه با سطح پایه در همان گروه)، # P<۰/۰۵ (در مقایسه با گروه دیابتی در همان هفته)***



نمودار ۳ : میزان مالون دی آلدئید بافت کلیه در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین
**** P<۰/۰۵ ، ** P<۰/۰۱ (در مقایسه با گروه کنترل)، # P<۰/۰۵ (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده)***



نمودار ۴ : میزان نیتریت و نیترات در بافت کلیه در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین
**** P<۰/۰۵ ، ** P<۰/۰۱ ، *** P<۰/۰۰۵ (در مقایسه با گروه کنترل)، # P<۰/۰۵ (در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده)***



نمودار ۵ : میزان فعالیت سوپراکسید دیس‌موتاز در بافت کلیه در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین

سطح مالون دی آلدئید (MDA) در بافت کلیه

با اندازه‌گیری سطح مالون دی آلدئید در گروه‌های مختلف در هفته ششم مشخص شد که MDA در گروه کنترل تحت تیمار با سیلی‌مارین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یک کاهش مختصر و غیرمعنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان داد. در گروه دیابتی تیمار نشده در هفته ششم سطح مالون دی‌آلدئید افزایش قابل ملاحظه و معنی‌دار نسبت به گروه کنترل نشان داد (P<۰/۰۱) و در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین میزان افزایش مالون دی آلدئید نسبت به گروه دیابتی کمتر بود. به علاوه، سطح مالون دی آلدئید در پایان هفته ششم در گروه دیابتی تیمار شده با سیلی‌مارین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه دیابتی بود (P<۰/۰۵) (نمودار ۳).

سطح نیتریت و نیترات در بافت کلیه

سطح نیتریت و نیترات در گروه کنترل تحت تیمار با سیلی‌مارین در حد مختصر پایین‌تر از گروه کنترل بود (نمودار ۴). به‌علاوه یک افزایش معنی‌دار در مورد آن در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل وجود داشت (P<۰/۰۰۵). در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین نیز این افزایش در حد کمتر نسبت به گروه کنترل وجود داشت (P<۰/۰۵ تا P<۰/۰۱). به‌علاوه در گروه دیابتی تحت تیمار با دوز بالای سیلی‌مارین میزان این متابولیت‌ها در مقایسه با گروه دیابتی به‌طور معنی‌دار کمتر بود (P<۰/۰۵).

سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در بافت کلیه

میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز در بافت کلیه در گروه کنترل تحت تیمار با سیلی‌مارین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل بدون تیمار یک کاهش مختصر و غیرمعنی‌دار نشان داد. در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل بدون تیمار فعالیت آنزیم سوپراکساید دیس‌موتاز به‌طور غیرمعنی‌دار افزایش یافت و در دو گروه دیابتی تحت تیمار با دوز پایین و بالای سیلی‌مارین نسبت به گروه دیابتی تغییر مطلوب و معنی‌دار فعالیت آنزیم مشاهده نشد (نمودار ۵).

بحث

این مطالعه نشان داد که تجویز چهارهفته‌ای سیلی‌مارین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از کاهش وزن حیوانات دیابتی تا حدی جلوگیری نمود و دارای اثر هیپوگلیسمیک بود. موش‌های دیابتی یک افزایش معنی‌داری در سطح مالون دی آلدئید و نیتریت و نیترات در بافت کلیه نشان دادند و درمان با سیلی‌مارین در دوز بالا میزان آنها را به صورت معنی‌دار کاهش داد. به علاوه، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس‌موتاز در بافت کلیه موش‌های دیابتی به‌طور غیرمعنی‌داری کاهش یافت و درمان با سیلی‌مارین افزایش مطلوب و معنی‌دار آن را موجب نشد.

کاهش کمتر وزن در گروه دیابتی تحت تیمار با سیلی‌مارین در این مطالعه را می‌توان به اثرات هیپوگلیسمیک و ضددیابتی آن نسبت داد. در همین ارتباط، مطالعه Soto و همکاران روی اثر سیلی‌مارین در رابطه با عملکرد پانکراس در حیوانات دیابتی نشان داد که این فلاوونولیگنان در جهت محافظت بافت پانکراس در برابر عوامل آسیب‌رسان عمل نموده و از این طریق اثرات هیپوگلیسمیک خود را اعمال می‌کند (۱۰). احتمالاً در بررسی حاضر بخشی از اثرات سیلی‌مارین بر کاهش قند خون موش‌های دیابتی را می‌توان به این مورد نسبت داد. به‌علاوه، فلاونوئیدهایی نظیر سیلی‌مارین مشتق از گیاه ماریتیغال می‌توانند از طریق تعدیل فعالیت آنزیم‌های کبدی مسؤول متابولیسم کربوهیدرات‌ها از جمله کاهش فعالیت آنزیم فسفریلاز کبدی و افزایش فعالیت گلوکوکیناز و گلیکوژن سنتاز در جهت کاهش قندخون و برگشت وزن به حد طبیعی عمل نمایند (۱۲). البته با توجه به این که در بررسی حاضر مدل دیابت قندی با استفاده از داروی سیتوتوکسیک استرپتوزوتوسین ایجاد گردید که موجب تیپ یک بیماری با عوارض بیوشیمیایی جدی‌تر می‌گردد و سطح انسولین در آن به علت فقدان سلول‌های مترشحه انسولین به حداقل می‌رسد (۱)؛ لذا اثرات سودمند سیلی‌مارین بر سطح گلوکز خون را می‌توان عمدتاً به اثرات خارج پانکراسی آن از جمله تعدیل فعالیت آنزیم‌های کبدی در مسیرهای متابولیسم کربوهیدرات‌ها و لیپیدها و بهبود مصرف این مواد در دو بافت چربی و عضلانی نسبت داد. نتایج مطالعات قبلی نیز اثرات سودمند تجویز سیلی‌مارین را بر کاهش قندخون در بیماران با دیابت نوع ۲ و مدل‌های تجربی دیابت نوع یک نشان داده‌اند (۱۷-۱۵) و این یافته‌ها تا حدی با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی دارد.

نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهند که به‌طور کلی در حالت دیابت قندی شامل نوع ۱ و ۲ استرس اکسیداتیو به علت ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد و سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی کاهش فعالیت نشان می‌دهند که این تغییرات مسؤول بخشی از آسیب‌های بافتی در حالت دیابت می‌باشند (۵و۶) و این تا حدودی در بررسی حاضر نیز به‌دست آمد. القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت یک رویکرد مهم برای حفاظت سلول‌ها در مقابل انواع مختلف ترکیبات سمی درونی و بیرونی از قبیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن محسوب می‌شود (۶و۱۸) و دیابت القاء شده با استرپتوزوتوسین با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اندوژن می‌تواند موجب تشدید آسیب بافتی گردد (۶). کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیس موتاز در موش‌های دیابتی در این بررسی مشاهده شد که ممکن است به علت افزایش پراکسیداسیون لیپید و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که این با نتایج بررسی‌های قبلی مطابقت دارد (۲۰). هرچند تیمار با دوز بالای سیلی‌مارین نتوانست به‌طور معنی‌داری آن را بهبود بخشد. در این رابطه به‌دنبال بروز دیابت با گذشت زمان میزان پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد که خود را با بالا رفتن سطح برخی مارکرها نشان می‌دهد که از بهترین آنها، مالون دی آلدئید و نیتریت و نیترات می‌باشند (۶و ۲۰). با توجه به این که استرس اکسیداتیو به علت تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد و این مواد به‌دنبال کامل نمودن مدار الکترونی خود می‌باشند؛ مواد تشکیل‌دهنده سلول از جمله ساختارهای پروتئینی و لیپیدی آسیب می‌بینند که این با تغییرات سطح آنزیم‌های بافتی نظیر کاهش سوپراکسید دیس‌موتاز خود را نشان می‌دهد (۱۶). افزایش سطح بافتی مالون دی آلدئید و کاهش فعالیت سیستم دفاعی سوپراکسیداز در بافت کلیه مشاهده شد و تجویز سیلی‌مارین در دوز بالا به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش سطح مارکرهای استرس اکسیداتیو در بافت کلیه گردید. بخشی از اثرات سودمند سیلی‌مارین در مطالعه حاضر را می‌توان به اثرات کاهش‌دهندگی استرس اکسیداتیو آن به‌علت دارابودن خاصیت آنتی‌اکسیدانتی و تقویت‌کنندگی سیستم حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن نسبت داد (۱۰-۸) و از این نظر بسیار مشابه ویتامین E عمل می‌نماید (۱۷). در این خصوص نشان داده شده که برخی فلاونوئیدها نظیر سیلی‌مارین می‌توانند موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها در بدن و تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی گردند (۱۰) و بدین ترتیب می‌توانند کاهش پراکسیداسیون لیپیدی را به‌دنبال داشته باشند (۸) که می‌تواند کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید در بافت کلیه در بررسی حاضر را نیز تا حدی توجیه نماید. بخش دیگر از اثر سودمند سیلی‌مارین در بررسی حاضر را می‌توان به اثر هیپوگلیسمیک آن نسبت داد که این از طریق کاهش دادن سطح محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون (AGE) موجب کاهش استرس اکسیداتیو و نشانه‌های آن از جمله مالون‌دی‌آلدئید در نواحی بافتی از جمله کلیه می‌گردد (۱۲). در این خصوص مطالعه Descorbeth و Anand-Srivastava نشان داد؛ افزایش قندخون در دیابت یکی از

علل اصلی افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشد (۵) و احتمالا سیلی‌مارین با کاهش دادن قندخون توانسته است از شدت استرس اکسیداتیو در بافت کلیه بکاهد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که تجویز چهارهفته‌ای سیلی‌مارین در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش صحرایی دارای اثر هیپوگلیسمیک بوده و می‌تواند برخی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کلیه را در موش‌های دیابتی کاهش دهد که این احتمالاً در جلوگیری از بروز عوارض دیابت در این بافت مؤثر است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر وافر خود را از خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد و سرکار خانم مریم شرایلی کارشناس گروه پاتولوژی در کمک به انجام آزمایشات اعلام می‌دارند.

References

1. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Med Sci Monit. 2006 Jul;12(7):RA130-47.

2. Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatement of diabetes mellitus: an overview. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003 Jun; 49(4):635-9.

3. Shapiro K, Gong WC. Natural products used for diabetes. J Am Pharm Assoc (Wash). 2002 Mar-Apr;42(2):217-26.

4. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. Rev Diabet Stud. 2010;7(1):15-25.

5. Descorbeth M, Anand-Srivastava MB. Role of oxidative stress in high-glucose- and diabetes-induced increased expression of Gq/11α proteins and associated signaling in vascular smooth muscle cells. Free Radic Biol Med. 2010 Nov;49(9):1395-405.

6. Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. Am J Transl Res. 2010 Jun;2(3):316-31.

7. Pazdro R, Burgess JR. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. Mech Ageing Dev. 2010 Apr; 131(4):276-86.

8. Toklu HZ, Tunali-Akbay T, Erkanli G, Yüksel M, Ercan F, Sener G. Silymarin, the antioxidant component of Silybum marianum, protects against burn-induced oxidative skin injury. Burns. 2007 Nov;33(7):908-16.

9. Láng I, Deák G, Nékám K, Müzes G, González-Cabello R, Gergely P, et al. Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy. Acta Med Hung. 1988;45(3-4):287-95.

10. Soto C, Recoba R, Barrón H, Alvarez C, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2003 Nov; 136(3):205-12.

11. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (Silybum marianum) for the therapy of liver disease. Am J Gastroenterol. 1998 Feb; 93(2):139-43.

12. Abascal K, Yarnell E. The Many Faces of Silybum marianum (Milk Thistle): Part 1 - Treating Cancer and Hyperlipidemia and Restoring Kidney Function. Alternat Complement Ther. 2003; 9(4): 170-5.

13. Sharma DK, Hall IH. Hypolipidemic, anti-inflammatory, and antineoplastic activity and cytotoxicity of flavonolignans isolated from Hydnocarpus wightiana seeds. J Nat Prod. 1991 Sep-Oct; 54(5):1298-302.

14. Sobolová L, Skottová N, Vecera R, Urbánek K. Effect of silymarin and its polyphenolic fraction on cholesterol absorption in rats. Pharmacol Res. 2006 Feb;53(2):104-12.

15. Hussain SA. Silymarin as an adjunct to glibenclamide therapy improves long-term and postprandial glycemic control and body mass index in type 2 diabetes. J Med Food. 2007 Sep; 10(3):543-7.

16. Huseini HF, Larijani B, Heshmat R, Fakhrzadeh H, Radjabipour B, Toliat T, et al. The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. Phytother Res. 2006 Dec;20(12):1036-9.

17. Soto C, Mena R, Luna J, Cerbón M, Larrieta E, Vital P,et al. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. Life Sci. 2004 Sep;75(18):2167-80.

18. Chtourou Y, Fetoui H, Sefi M, Trabelsi K, Barkallah M, Boudawara T, et al. Silymarin, a natural antioxidant, protects cerebral cortex against manganese-induced neurotoxicity in adult rats. Biometals. 2010 Dec;23(6):985-96.

19. Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, Roghani M. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid β(1-40) rat model of Alzheimer's disease. Neurobiol Learn Mem. 2011 Mar; 95(3):270-6.

20. Nasri S, Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Rabani T, Balvardi M. Vascular mechanisms of cyanidin-3-glucoside response in streptozotocin-diabetic rats. Pathophysiology. 2011 Sep; 18(4):273-8.