"Research article:1423"

Protective effect of Naringenin (*Citrus flavonone*) on incipient diabetic nephropathy in alloxan-induced diabetic rats

Doustar, Y.[1*], Elahi, R.[2], Mohajeri, D.[3]

1- Associate Professor, Department of Pthobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Assistant Professor Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3- Professor, Department of Pthobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
Corresponding authors email: vetdoustar@gmail.com
(Received: 2023/9/27 Accepted: 2024/1/6)

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic abnormality that has a relatively high prevalence throughout the world. Kidney failure is one of the main complications of diabetes. Many therapeutic methods have been introduced from all over the world to treat diabetes. The aim of the present study was to assess the protective effect of Naringenin on early kidney injuries in alloxan-induced diabetic rats. Forty male Wistar rats were randomly allocated into 4 equal groups, including: healthy control, Naringenin treated, diabetic and diabetic receiving Naringenin. Diabetes was induced by intra-peritoneal injection of a single dose of naloxone (120 mg/kg). Naringenin treatment groups received the drug (50 mg/kg) daily for 3 weeks through gavage. Finally, serum levels of kidney function markers including urea, uric acid and creatinine as well as the amount of lipid peroxidation product (MDA) and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) were assessed in kidney hemogenates. Moreover, histopathological observation was conducted to assess the degree of renal injury. Naringenin significantly increased the levels of serum urea, uric acid and creatinine ($p<0.05$) in alloxan induced diabetic rats. Furthermore, naringenin significantly reduced the amount of lipid peroxidation in all diabetic rats and increased the levels of antioxidant enzymes ($p<0.05$). Histopathological changes were in agreement with biochemical findings. The results of the present study showed that naringenin with its antioxidant properties can prevent early diabetic kidney damage.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Alloxan, Diabetes, Naringenin, *Citrus flavonone*, Nephropathy, Rat.

"مقاله پژوهشی"

مطالعه تاثیر محافظتی نارینژنین (*Citrus flavonone*) بر نفروپاتی پیشرس دیابتی در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده توسط آلوکسان

یوسف دوستار[1*]، رامین کفاشی‌الهی[2]، داریوش مهاجری[3]

۱- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۳- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: vetdoustar@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۷/۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶)

چکیده

دیابت شیرین یک ناهنجاری متابولیکی است که از میزان شیوع نسبتاً بالایی در سراسر دنیا برخوردار است. نارسایی کلیوی از عوارض اصلی بیماری دیابت محسوب می‌شود. روش‌های درمانی زیادی از کل دنیا برای مداوای دیابت معرفی شده‌اند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی تاثیر حفاظتی نارینژنین بر آسیب پیش‌رس کلیوی در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده توسط آلوکسان بود. بدین منظور تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به‌شکل تصادفی در ۴ گروه یکسان، شامل گروه‌های شاهد سالم، تیمار با نارینژنین، دیابتی و دیابتی تیمار با نارینژنین توزیع شدند. دیابت تجربی توسط تزریق داخل صفاقی تک‌دز آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) ایجاد گردید. همچنین موش‌های تیمار شده با نارینژنین (۵۰ mg/kg) دارو را از طریق گاواژ، روزانه و به مدت ۳ هفته دریافت کردند. در پایان، مقادیر سرمی شاخص‌های عملکرد کلیه شامل اوره، اسید اوریک و کراتینین و همچنین میزان محصول پراکسیداسیون لیپیدی (مالوندی آلدئید) و نیز فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در هموژنات بافت کلیه موش‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، بررسی هیستوپاتولوژیکی برای ارزیابی شدت درجات آسیب در کلیه موش‌ها هم انجام شد. در موش‌های دیابتی‌شده با آلوکسان، نارینژنین به طور معنی‌داری میزان اوره، اسید اوریک و کراتینین سرم را افزایش داد ($p<۰/۰۵$). همچنین، نارینژنین به‌طور معنی‌داری میزان پراکسیداسیون لیپیدی را در کلیه موش‌های دیابتی کاهش و سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در آنها افزایش داد ($p<۰/۰۵$). یافته‌های هیستوپاتولوژی کلیه نیز با یافته‌های بیوشیمیایی در توافق بودند. نتایج بررسی حاضر نشان داد که نارینژنین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود از بروز آسیب‌های زود هنگام دیابتی کلیه می‌تواند پیش‌گیری کند.

کلیدواژه‌ها: نارینژنین، دیابت، آلوکسان، نفروپاتی، موش صحرایی.

مقدمه

دیابت نوع دو شایع‌ترین نوع دیابت به‌شمار آمده و به‌عنوان یک معضل و مشکل در بهداشت جهانی همچنان رو به افزایش است (Alberti and Zimmet, 1998). بیماری دیابت اختلالی مزمن در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی و پروتئین به شمار رفته و منجر به بالارفتن میزان قند خون می‌شود که متعاقباً باعث آسیب‌های شدید در عروق و بافت های مختلف بدن می‌شود (Kesari *et al*., 2005). اگرچه پاتوژنز بیماری دیابت نوع دو دقیقاً مشخص نشده است، ولی مستندات موجود آشفتگی در سوخت و ساز گلوکز و چربی در این میان موثر قلمداد شده است (McGarry, 1992). سندرم متابولیک، با تغییراتی در متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین، ثانویه به عدم حضور یا ترشح کم انسولین و یا اختلال در عملکرد آن ایجاد گردیده و هیپرگلیسمی نیز جزء لاینفک بیماری دیابت و شاخصی مهم در تشخیص و درمان آن، محسوب می‌شود (Holman and Turner, 1991).

شواهد زیادی موجود هست که حاکی از نقش استرس اکسیداتیو و در پی آن تولید رادیکال‌های آزاد در بدن مبتلایان به دیابت و دخالت این عوامل در پاتوژنز این بیماری است (Cerielo *et al*., 1997; Kaneto *et al*., 2007; Butler *et al*., 2008). هیپرگلیسمی از طریق افزایش تولید AGEs (Advanced glycation end products) باعث تسهیل در تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species; ROS) از طریق اختلال در عملکرد زداینده‌های درونزاد رادیکال‌های آزاد نظیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide desmotase; SOD)، کاتالاز (Catalase; CAT) و کلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase; GPX) می‌گردد (Kalia *et al*., 2004; Cameron *et al*., 2005; Jandeleit-Dahm *et al*., 2005). بنابراین، بیماری دیابت از طریق افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و القاء تنش‌های اکسیداتیو باعث ایجاد آسیب در سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن می‌شود (Signorini *et al*., 2002). بدیهی است که عوارض ناشی از دیابت توسط عوامل مختلف و متعددی ایجاد می‌گردند و بنابراین، صرفاً از طریق کنترل افزایش قند خون قابل پیشگیری و درمان نیستند (Liu *et al*., 2008). هرچند که در مراحل ابتدای بیماری، آسیب سلول‌ها و بافت‌ها توسط ازدیاد قند خون ایجاد می‌شود، اما پیشرفت آسیب به برقراری فزونی قند خون مرتبط نیست (Vestra and Fioretto, 2003). بنابراین، کنترل مقدار قند خون به تنهایی برای پیشگیری از عوارض دیابت کافی نیست.

سلول‌های سالم با مکانیسم‌های مختلف و متنوعی در مقابل آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد از خود مراقبت می‌کنند. آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پاراُکسوناز در این میان نقش اساسی دارند. پاراُکسوناز یک استراز وابسته به یون کلسیم است که در بافت‌هایی نظیر کبد، کلیه، روده و همچنین سرم وجود داشته و به نقش آن در دیابت نیز اشاره شده است. (Aviram *et al*., 1999; Tas *et al*., 2006; Rozenberg *et al*., 2008).

با توجه به نقش مهم رادیکال‌های آزاد در پاتوژنز بیماری دیابت، یکی از زمینه‌های مورد بحث در درمان این بیماری و کنترل عوارض ناشی از آن، اتخاذ تدابیری در جهت کاهش تولید رادیکال‌های آزاد است (Butler

et al., 2008). در این مسیر، طی مطالعاتی اثر انواع آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری و یا کاهش آسیب‌های وارده از طریق استرس‌های اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار گرفته است (El-Bassiouni *et al*., 2005; Peerapatdit *et al*., 2006). میزان وقوع آسیب از نوع پراکسیداسیون لیپیدی در اجزای سلولی در اثر استرس‌های اکسیداتیو، توسط مکانیسم‌های تدافعی مختلفی که شامل سیستم‌های پاکسازی‌کننده آنزیمی و غیرآنزیمی رادیکال‌های آزاد هستند، کنترل می‌گردد (Wohaieb and Godin, 1987). بنابراین، عواملی که بتوانند به هر طریق ممکن از آسیب‌های اکسیداتیو سلول‌ها جلوگیری کنند، مقاومت سلول‌ها و بافت‌ها را در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد افزایش می‌دهند. کنترل بیماری دیابت در مبتلایان بدون وقوع هیچ‌گونه عارضه جانبی، هنوز مورد بحث محققین می‌باشد و در این بین درخواست بیماران دیابتی برای استفاده از فرآورده‌های با منشأ طبیعی و با خواص درمان دیابت همچنان رو به افزایش است، چرا که داروی انسولین و سایر داروهای کاهنده قند خون دارای عوارض و اثرات جانبی ناخواسته فراوانی هستند (Kameswara Rao and Appa Rao, 2001). پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در زمینه کنترل بیماری دیابت نوع دو توسط داروهای سنتتیک به‌دست آمده است، ولی سعی و تلاش برای دستیابی به عوامل طبیعی برای مقابله با عوارض ناشی از این بیماری همچنان ادامه دارد. در این راستا شناسایی انواع جدید آنتی‌اکسیدان‌ها با منشأ گیاهی به‌طور جد مورد توجه محققین بوده است (Srivastava *et al*., 1993).

فلاوونوئیدها ترکیبات پلی‌فنلی با خصوصیات فارماکولوژیک متعدد بوده و به‌عنوان زداینده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Arul and Subramanian, 2013; Keser *et al*., 2013). بر اساس تفاوت در ساختار مولکولی این ترکیبات، شش گروه عمده از فلاوونوئیدها وجود دارد که شامل: فلاوون‌ها (flavones)، فلاوونول‌ها (flavonols)، ایزوفلاوون‌ها (isoflavones)، فلاوانون‌ها (flavanones)، کاتچین‌ها (catechins) و آنتوسیانیدین‌ها (anthocyanidins) هستند (Kinoshita *et al*., 2006). نارینژنین (Naringenin)، ۷،۵،۴-تری‌هیدروکسی-تری-هیدروکسی‌فلاوانون (4,5,7-trihydroxyflavanone) فلاوانونی هست که به مقدار زیاد در میوه خانواده مرکبات مثل گریپ فروت، نارنگی و پرتغال و همچنین گیلاس، گوجه فرنگی و کاکائو یافت می‌شود (Kawaii *et al*., 1999; Jain *et al*., 2011). به‌طور طبیعی، این فلاوانون به فورم گلیکوزید تبدیل شده و جذب روده‌ای خود را ارتقاء می‌دهد (Haidari *et al*., 2009).

تحقیقات نشان داده‌اند نارینژنین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و مراقبت از بافت عصبی می‌باشد (Miyake *et al*., 2003; Hirai *et al*., 2007; Choi and Ahn, 2008; Lee and Kim, 2010; Nalini *et al*., 2012). نارینژنین با سه گروه هیدروکسیل خود نسبت به سایر فلاوانون‌ها توانایی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی دارد (Chiou and Xu, 2004; Pollard *et al*., 2006). مطالعات اثرات ضددیابتی (Ortiz-Andrade *et al*., 2008)، کاهندگی چربی خون (Mulvihill *et al*., 2009)، ضدسرطانی (Jong-Hwa *et al*., 2010)، ضدآتروژنی (Lisa *et al*., 1999)، ضدافسردگی (Zbarsky *et al*., 2005)،

تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی (Lisa *et al.*, 1999) و محافظت‌کنندگی از ژنوم (Oršolić *et al.*, 2011) نارینژنین را نشان داده‌اند.

مواد و روش‌ها

مطالعه پیش‌رو از نوع تجربی مداخله‌گر آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۴۰۱ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه پروتکل‌های کار روی مدل‌های حیوانات آزمایشگاهی و ملاحظات اخلاقی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

برای انجام مطالعه حاضر، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰ ± ۲۰۰ گرم و سن ۱۰ هفته از محل پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تبریز خریداری و به‌طور تصادفی در ۴ گروه سری شامل گروه‌های: شاهد سالم، سالم تیمار با نارینژنین، دیابتی و دیابتی تیمار با نارینژنین توزیع شدند. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان در نظر گرفته شد. چرخه روشنایی/تاریکی به صورت ۱۲ ساعته بود و دمای محیط در ۲ ± ۲۱ درجه سلسیوس تنظیم گردید. جیره غذایی استاندارد (به شکل پلت) و آب به‌طور آزادانه در دسترس حیوانات قرار گرفت. جهت تسریع در ایجاد نفروپاتی دیابتی، نفرکتومی کلیه راست در همه موش‌ها با ایجاد بیهوشی از طریق تزریق داخل صفاقی پنتوباربیتال سدیم (Alfasan, Netherland) به‌میزان ۵۰ mg/kg انجام شد (Anderson *et al.*, 1992; Yong-Gui Wu *et al.*, 2006). دو هفته پس از انجام نفرکتومی، برای دیابتی‌کردن موش‌ها، محلول تازه تهیه شده آلوکسان با دز ۱۲۰ mg/kg به‌صورت محلول در آب مقطر (۵ درصد)، بعد از ۱۵ ساعت پرهیز غذایی، از راه داخل صفاقی به موش‌های گروه‌های دیابتی تزریق شد. موش‌های با میزان قند خون بیش از ۲۴۰mg/dl به عنوان دیابتی مدّ نظر قرار گرفتند (Gupta *et al.*, 2005). از کیت سنجش قند خون ساخت شرکت زیست شیمی نیز برای اندازه‌گیری مقدار گلوکز خون موش‌ها استفاده شد. میزان انسولین پلاسما نیز به‌وسیله کیت رادیوایمنواسی (Pharmacia, Uppsala, Sweden) و توسط کانتر بتاماتیک (Cronex, Dupont, France) مورد سنجش قرار گرفت. کیت مورد استفاده طبق بروشور حاوی انسولین انسانی به عنوان استاندارد و آنتی‌بادی نشاندار 125I انسولین انسانی می‌باشد که با انسولین موش صحرایی واکنش متقاطع دارد.

میزان و طریقه استفاده از نارینژنین بر اساس مطالعات آنادورای و همکاران در سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ تعیین گردید (Annadurai *et al.*, 2012; Annadurai *et al.*, 2013). موش‌های گروه‌های دریافت‌کننده نارینژنین، نارینژنین پودری (Sigma, USA) را با حل کردن در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید، به میزان ۵۰ mg/kg، روزانه و به مدت سه هفته به‌طور خوراکی از طریق گاواژ دریافت کردند. به موش‌های گروه‌های شاهد متناظر نیز سالین نرمال با حجم برابر تزریق شد. سایر شرایط نگه‌داری برای تمامی گروه‌ها یکسان بود.

پس از سه هفته تیمار، به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های سرمی عملکرد کلیه‌ها شامل اوره

(Fawcett and Scott, 1960)، اسید اوریک (Caraway, 1955) و کراتینین (Teitz, 1987)، نمونه خون از سینوس پشت کره چشم (retro-orbital plexus) توسط لوله‌های مویین (شیمی‌بیو، ایران) موش‌ها اخذ گردید. سرم خون توسط سانتریفیوژ با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس جدا شد. هم‌زمان همه موش‌ها با قطع سر (decapitation) آسان‌کُشی شدند. کلیه چپ موش‌ها سریعا خارج گردیده و قطعاتی از آنها جدا و پس از شستشو در سالین بسیار سرد، توزین و هموژنات ۱۰ درصد در ۱/۱۵ درصد (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با شتاب ۷۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول شناور جهت سنجش میزان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی اجزای سلولی (malondialdehyde; MDA) و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase; SOD)، کاتالاز (Catalase; CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase; GPX) و گلوتاتیون ردوکتاز (Glutathione reductase; GR) مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مذکور و میزان MDA و پروتئین در محلول شناور با استفاده از کیت‌های تجاری موجود (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستور شرکت سازنده کیت انجام شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین عنوان گردید.

پراکسیداسیون چربی در کلیه با روش رنگ‌سنجی به وسیله اندازه‌گیری TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش فراگا و همکاران در سال ۱۹۸۸ انجام شد (Fraga *et al.*, 1988). به طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر راژین TBA-trichloroacetic acid—Hcl reagent (۳۷ درصد TBA، ۰/۲۵ مول Hcl و ۱۵ درصد TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه حمام بخار، خنک گردیده و در ۳۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول شناور شفاف در طول‌موج ۵۳۵ nm در مقابل بلانک قرائت شد. مقادیر به صورت نانومول/۱۰۰ گرم بافت بیان گردید.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز توسط روش نیشیکیمی و همکاران در سال ۱۹۷۲ اندازه‌گیری شد (Nishikimi *et al.*, 1972). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هموژنات کلیوی با بافر پیروفسفات سدیم، PMT (Phenazine methosulfate) و NBT (Nitro-blue Terazolium) مخلوط گردید. واکنش با افزودن NADH (Nicotinamide-adenine dinucleotide) آغاز گردید. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه گرم‌خانه‌گذاری شده و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگزای تشکیل‌شده در ۵۶۰nm اندازه گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز توسط روش کلایبورن در سال ۱۹۸۵ و براساس تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج

۲۴۰ nm، مورد سنجش قرار گرفت (Claiborne, 1985). به‌طورخلاصه، مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافرفسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۷)، ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۰/۰۱۹ مولار و ۰/۰۵ میلی‌لیتر فسفات بافر ۱۰ درصد در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر می‌باشد. تغییرات در جذب، در طول موج ۲۴۰nm اندازه‌گیری گردید. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه شد.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز با استفاده از روش روتراک و همکاران در سال ۱۹۷۳ و بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (Rotruck *et al.*, 1973).

$$H2O2+2GSH \rightarrow 2H2O+GSSG$$

گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور هم زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقی‌مانده توسط محلول DTNB (Dithiobis nitrobenzoic acid) مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنشگر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA (Ethylenediamine tetra-acetic acid) ۰/۸ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (Sodium azide) ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۳ میلی‌لیتر دی سدیم هیدروژن ۰/۸ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰۴ درصد به محلول شناور افزوده شده و بلافاصله رنگ حاصله در ۴۲۰ nm اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به صورت میکرومول گلوتاتیون اکسید/دقیقه/میلی گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش مهنداس و همکاران در سال ۱۹۸۴ بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (Mohandas *et al.*, 1984).

$$NADPH+H^{+} +GSSG \rightarrow NADP^{+} +2GSH$$

در حضور گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون اکسید، احیاء شده و هم‌زمان، NADPH به $NADP^{+}$ اکسیده می‌شود. فعالیت آنزیم در دمای اتاق توسط سنجش میزان ناپدید شدن NADPH/ دقیقه در ۳۴۰ nm، با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید.

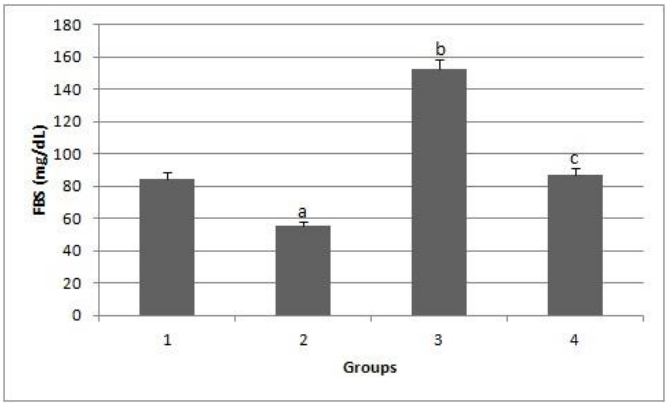
جهت ارزیابی و مقایسه شدت درجات آسیب در بافت کلیه موش‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، از کلیه تمامی موش‌ها نمونه‌های بافتی اخذ و در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار شدند. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین تهیه شد (Lee and Luna, 1988). بررسی مقاطع آسیب‌شناسی کلیه توسط یک مقیاس نیمه کمّی (semiquantitative scale) و به‌صورت دوسوکور جهت ارزیابی شدت آسیب گلومرولی-توبولی (glomerulo-tubular) و ارتشاح بینابینی سلول‌های آماسی انجام گردید. شدت آسیب از صفر تا ۴+ (صفر نشانگر کلیه طبیعی، ۱+ نشانگر آسیب جزئی، ۲+ نشانگر آسیب متوسط، ۳+ نشانگر آسیب شدید و ۴+ نشانگر آسیب در کل بافت کلیه) درجه‌بندی شد. تمامی درجه‌بندی‌ها با بزرگنمایی

۱۰۰× و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به‌طور تصادفی انجام شد.

-**تحلیل آماری داده‌ها**: داده‌های به‌دست آمده کمی، به‌صورت mean±S.E.M ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ توسط نرم‌افزار آماری SPSS مورد واکاوی قرار گرفت. داده‌های مربوط به آسیب‌شناسی بافتی نیز توسط آزمون غیرپارامتریک کروسکال‌والیس (the Kruskal wallis test) و آزمون تعقیبی یومن وایتنی (U mann whitney test) مورد تحلیل قرار گرفت. همچنین مقادیر p کوچکتر از ۰۵/۰، معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

نتایج تاثیر تیمار روزانه با نارینژنین با مقدار مصرف ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳ هفته بر میزان قند خون موش‌های مورد مطالعه در نمودار ۱ ارائه شده است. نارینژنین اثر هیپوگلیسمیک معنی‌داری در موش‌های سالم ($p<۰/۰۵$) و دیابتی ($p<۰/۰۱$) بعد از ۳ هفته تیمار، ایجاد کرد.



نمودار ۱- مقایسه تاثیر نارینژنین بر میزان قند خون در موش‌های صحرایی مورد مطالعه (mean±SEM)
a,b: در مقایسه با گروه ۱ (شاهد سالم)، c در مقایسه با گروه ۳ (دیابتی) ($p<۰/۰۵$).

در موش‌های گروه دیابتی سطوح سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت. در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین، مقادیر افزایش‌یافته پارامترهای مذکور به‌طور معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) و تا حد نرمال کاهش یافت. در موش‌های گروه سالم تیمار با نارینژنین، تغییر معنی‌داری در پارامترهای مذکور ایجاد نگردید (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر نارینژنین بر سطوح سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی (mean±SEM)

گروه	فراسنجه‌های بیوشیمیایی		
	اوره (mg/dl)	اسید اوریک (mg/dl)	اسید اوریک (mg/dl)
شاهد سالم	۲۸/۰±۵۲/۴۱	۱/۰±۱۹/۹۰	۱/۰±۰۶/۰۹
سالم تیمار با نارینژنین	۲۷/۰±۴۰/۵۴	۱/۰±۲۳/۱۲	۱/۰±۰۹/۱۳
دیابتی	۴۱/۰±۱۸/۶۲*	۲/۰±۶۱/۳۱*	۲/۰±۵۵/۲۷*
دیابتی تیمار با نارینژنین	۳۰/۰±۱۴/۶۵	۱/۰±۲۴/۱۷	۱/۰±۱۴/۱۸

*: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد سالم ($p<۰/۰۵$).

در گروه دیابتی، فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در مقایسه با گروه شاهد سالم، به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش و میزان TBARS به‌عنوان مقیاسی از پراکسیداسیون لیپیدی به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت. در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین، نارینژنین به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مانع از افزایش TBARS و به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مانع از کاهش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در اثر دیابت شد. در موش‌های گروه سالم تیمار با نارینژنین تغییر معنی‌داری در میزان پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌های بافت کلیه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ایجاد نشد (جدول ۲).

جدول ۲- تاثیر نارینژنین بر فعالیت آنتی اکسیداتیوی کلیه در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی (mean±SEM)

گروه	فراسنجه‌های بیوشیمیایی				
	TBARS (nmol/g protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	GPX (U/mg protein)	GR (U/mg protein)
شاهد سالم	۲۰/۱±۲۶/۳۱	۹/۰±۵۹/۵۰	۵۱/۵±۵۵/۱۹	۲۵/۱±۸۰/۵۴	۱۱۴/۸±۱۲/۱۵
سالم تیمار با نارینژنین	۱۸/۱±۱۸/۲۶	۱۰/۰±۱۸/۳۷	۵۳/۵±۵۳/۳۱	۲۷/۱±۳۳/۸۲	۱۰۸/۶±۱۶/۵۲
دیابتی	۴۵/۱±۵۰/۶۵*	۵/۰±۴۷/۱۸*	۲۵/۲±۳۳/۸۰*	۱۶/۰±۲۱/۶۳*	۷۵/۴±۱۳/۸۴*
دیابتی تیمار با نارینژنین	۲۳/۱±۰۶/۱۴	۸/۰±۷۰/۲۹	۴۸/۴±۵۱/۹۷	۲۴/۱±۸۱/۲۳	۹۹/۵±۸۶/۷۲

*: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد سالم ($p<۰/۰۵$).

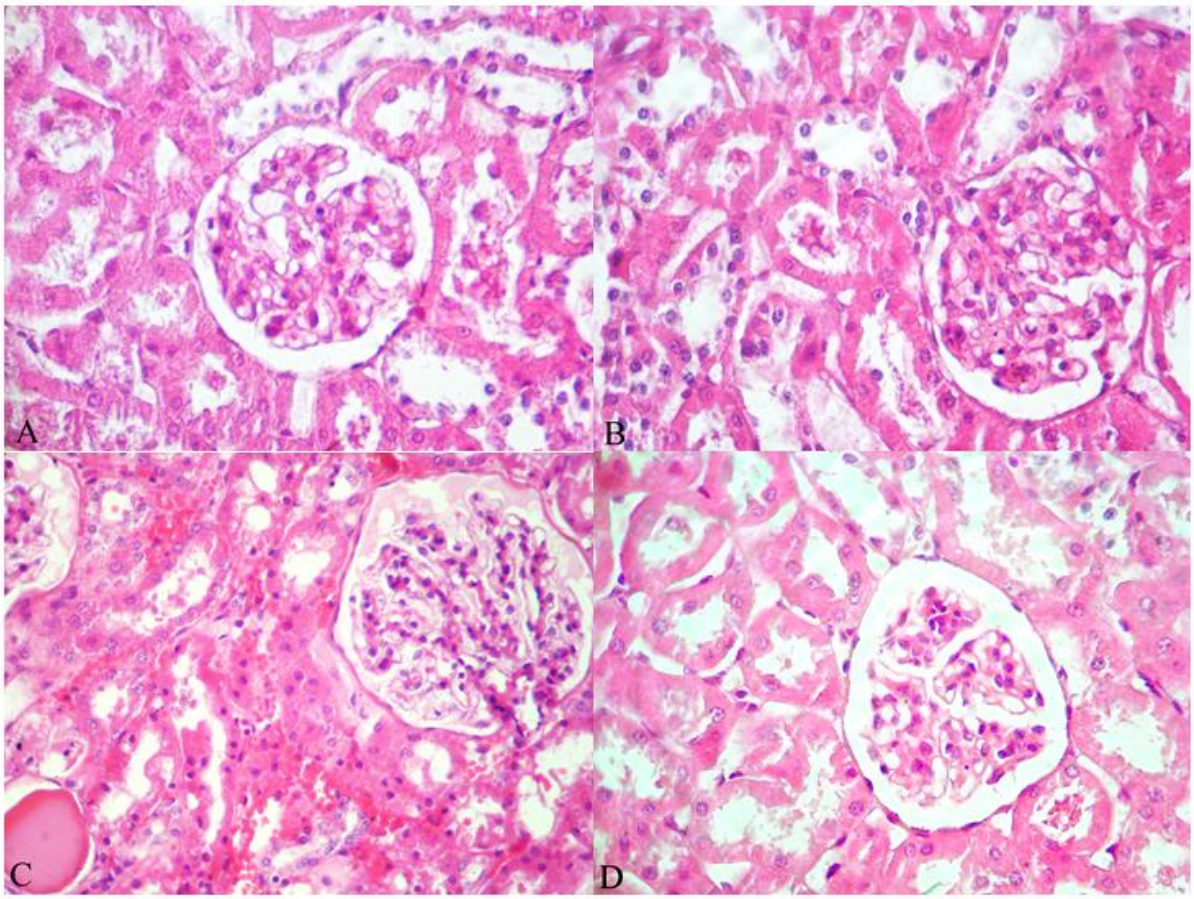
در گروه‌های شاهد سالم و سالم تیمار با نارینژنین، بافت کلیه کاملاً طبیعی بود و تفاوت قابل ملاحظه‌ای از لحاظ آسیب‌شناسی بافتی بین آن‌ها مشاهده نشد. تغییرات هیستوپاتولوژی کلیه در موش‌های صحرایی دیابتی و دیابتی تیمار با نارینژنین در شکل ۱ نشان داده شده است. در بافت کلیه موش‌های گروه دیابتی، افزایش ضخامت غشاءهای پایه گلومرولی و افزایش ماتریکس مزانژیال مشاهده شد. اتساع فضای ادراری همراه با تجمع قطرات ریز هیالنی پروتئینی (Hyaline proteinaceouse droplets) در آن، چسبندگی پرده‌های احشایی و جداری کپسول بومن (Synechiae) و هیپرسلولاریتی ملایم مزانژیال همرا با پرخونی و گاهی

اوقات نکروز سلول‌های سنگفرشی پرده جداری کپسول بومن نیز قابل مشاهده بود. در لوله‌های ادراری تورم سلول‌های پوششی و افزایش ضخامت غشاء بازال توبولی نیز قابل توجه بود. کست‌های هیالن که در برخی مواقع با انسداد و اتساع توبول‌ها همراه بودند، در داخل توبول‌ها قابل مشاهده بودند. مناطق پرخونی و خونریزی همراه با ادم و ارتشاح لنفوسیتی در بافت بینابینی کلیه کاملاً مشخص بود. در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین، نارینژنین به‌طور قابل ملاحظه‌ای مانع از بروز آسیب‌های پاتولوژیک فوق در موش‌های دیابتی شد، به‌طوری‌که در بافت کلیه آنها به‌جز پرخونی جزئی و تورم خفیف سلول‌های توبولی، آسیب قابل توجهی مشاهده نشد. شدت آسیب گلومرولی-توبولی (Glomerulo-tubular) و ارتشاح بینابینی سلول‌های آماسی و فیبروز بینابینی در جدول ۳ بین گروه‌های مورد مطالعه مقایسه گردیده است.

جدول ۳- مقایسه شدت آسیب توبولی-بینابینی و ارتشاح سلول‌های آماسی و فیبروز بین گروه‌های مورد مطالعه (mean±SEM)

گروه	تغییرات پاتولوژیک	
	آسیب توبولی-بینابینی	ارتشاح سلول‌های التهابی و فیبروز
شاهد سالم	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰
سالم تیمار با نارینژنین	۰/۰±۰/۰	۰/۰±۰/۰
دیابتی	۲/۰±۶۰/۲۳*	۳/۰±۴۰/۲۲*
دیابتی تیمار با نارینژنین	۰/۰±۳۰/۰۲	۰/۰±۳۲/۰۲

*: نشانگر اختلاف معنی‌دار با گروه شاهد سالم ($p<۰/۰۵$).



شکل ۱- نمای ریزبینی از کلیه موش‌های صحرایی مورد مطالعه (هماتوکسیلین-ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰×). در نمای ریزبینی ساختار بافت کلیه در گروه شاهد سالم طبیعی می‌باشد (A). در گروه سالم تیمار با نارینژنین نیز تغییر پاتولوژیک خاصی مشاهده نمی‌شود (B). در گروه دیابتی در بافت کلیه افزایش قابل توجه در ضخامت غشاءهای پایه گلومرولی و ماتریکس مزانژیال و چسبندگی پرده‌های احشایی و جداری کپسول بومن دیده می‌شود. اتساع فضای ادراری همراه با تجمع مواد پروتئینی و واکوئولاسیون در سیتوپلاسم سلول‌های اپی‌تلیال توبول‌ها مشخص می‌باشد. هیپرسلولاریتی مزانژیال همراه با پرخونی گلومرول و چسبندگی پرده‌های احشایی و جداری کپسول بومن توام با پرخونی و خونریزی خفیف بینابینی قابل مشاهده می‌باشد. کست‌های هیالن همراه با خونریزی در بافت بینابینی کلیه مشخص می‌باشد. نکروز سلول‌های توبولی و ارتشاح تک هسته‌ای‌ها در بافت بینابینی کلیه کاملاً مشخص می‌باشد (C). در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین، نارینژنین از بروز تغییرات پاتولوژیک جلوگیری کرده، بافت کلیه تقریباً طبیعی بوده و به غیر از واکوئولاسیون خفیف سلول‌ها تغییر پاتولوژیک خاصی در آن مشاهده نمی‌شود (D).

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر مصرف نارینژنین به میزان ۵۰ mg/kg و به مدت ۳ هفته از راه خوراکی باعث کاهش قند خون در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی گردید. یافته‌های بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی بررسی حاضر نیز حاکی از آسیب کلیه در موش‌های صحرایی دیابتی می‌باشد. در این مطالعه، القاء دیابت باعث افزایش معنی‌دار مقادیر سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین و همچنین افزایش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید و کاهش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز بافت کلیه در مقایسه با

گروه شاهد سالم شد. تغییرات معنی‌دار در مقادیر پارامترهای فوق نشان از آسیب‌های کلیوی دارد (Burtis and Ashwood 1996). در این مطالعه، استفاده از نارینژنین به‌طور معنی‌داری مانع از افزایش مقادیر سرمی اوره، اسید اوریک و کراتینین در موش‌های صحرایی دیابتی شد. همچنین مصرف نارینژنین مانع از افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید و کاهش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در اثر دیابت شد که این اثر ممکن است به‌دلیل پاکسازی رادیکال‌های آزاد توسط نارینژنین باشد که منجر به حفظ و بقاء این آنزیم‌ها شده است. روی و همکاران ایشان در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که نارینژنین با کاهش TGF-β1 و IL-1 از طریق تعدیل استرس اکسیداتیو، اختلال کلیوی موش‌های صحرایی دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین را بهبود می بخشد که یافته‌های ایشان با نتایج مطالعه حاضر در توافق می‌باشد (Roy *et al*., 2016). همچنین، طی مطالعه‌ای که توسط خان و همکاران وی در سال ۲۰۲۲ انجام شده، اثرات محافظتی نارینژنین از نفروتوکسیسیتی ناشی از هیپرگلیسمی در موش‌های صحرایی دیابتی به اثبات رسیده است که طبق اظهار نظر ایشان این تاثیر به دلیل ممانعت از استرس توری آندوپلاسمیک اتفاق افتاده است (Khan *et al*., 2022). یافته های یان و همکاران وی در سال ۲۰۱۶ نشان داد که نارینژنین با تنظیم سیگنال دهی let-7a/TGFBR1 (let-7a/transforming growth factor-β1 receptor 1) آسیب کلیه را در موش‌های صحرایی دیابتی بهبود می بخشد (Yan *et al*., 2016).

در بررسی حاضر، افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در بافت کلیه موش‌های صحرایی دیابتی نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، یکی از مکانیسم‌های محتمل در پاتوژنز آسیب کلیوی دیابت می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین اسیدهای چرب غیراشباع شبکه داخل سیتوپلاسمی گردیده که منجر به تشکیل پراکسیدهای لیپیدی (مالون‌دی‌آلدئید) و از دست رفتن سالم بودن غشاء سلول‌ها و در نهایت آسیب کلیه شده است. افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در موش‌های دیابتی، نشان‌دهنده افزایش واکنش‌های پراکسیداسیونی است‌که به ضعف مکانیسم‌های تدافعی آنتی‌اکسیدانی نیز منجر گردیده و بدین‌ترتیب ممانعت از تولید زیاد از حدّ رادیکال‌های آزاد هم ممکن نخواهد بود (Naik, 2003). به عبارتی دیگر افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در کلیه حاکی از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است که منجر به آسیب بافت کلیه و همچنین ناتوانی مکانیسم تدافعی آنتی‌اکسیدانی در ممانعت از تشکیل بی‌رویه رادیکال‌های آزاد می‌گردد.

نقش استرس اکسیداتیو و مداخله گونه‌های فعال اکسیژن در پاتوژنز نفروپاتی دیابتی به اثبات رسیده است (Noyan, 2005). سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز آنزیم‌های آنتی اکسیدانی هستند که سیستمی تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن تشکیل داده‌اند (Lil, 1988). این آنزیم‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیماتیک هستند. سوپراکسید دیسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن زدوده و بدین ترتیب اثرات توکسیک آن را کاهش می‌دهد (Curtis

1972). در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های دیابتی به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که در پی آن فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز نیز در این موش‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود. کاتالاز آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در بافت‌های حیوانی به طور گسترده‌ای منتشر می‌شود و دارای بیشترین فعالیت در کبد و گلبول‌های قرمز است. کاتالاز، پراکسید هیدروژن را تجزیه می‌کند و باعث محافظت بافت‌ها از رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل می‌شود (Chance, 1952). بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است منجر به برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد.

گلوتاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی کبدی است که در کاهش گلوتاتیون اکسید (GSSG)، به‌عنوان محصول نهایی فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بر روی گلوتاتیون احیاء (GSH)، دخیل می‌باشد (Suresh and Vandana, 2008). متعاقب القاء دیابت در بررسی حاضر کاهش قابل توجهی در میزان گلوتاتیون پراکسیداز حاصل گردید که منجر به دسترسی گلوتاتیون ردوکتاز به سوبسترا شد که بدین ترتیب فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز کاهش یافت. مصرف نارینژنین در موش‌های دیابتی فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز را مجدداً برقرار نموده که مصرف GSSG را جهت تشکیل گلوتاتیون احیاء و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال توسط کونژوگاسیون با گلوتاتیون احیاء برقرار می‌کند.

پر واضح است که نفروپاتی دیابتی توسط فاکتورهای متعددی ایجاد می‌گردد و لذا تنها از طریق کنترل هیپرگلیسمی و فشار خون قابل پیشگیری نیست (Liu *et al*., 2008). اگرچه در مراحل اولیه بیماری، تغییرات نفروپاتی دیابتی توسط هیپرگلیسمی القاء می‌شود، اما آسیب‌های بعدی به ابقاء هیپرگلیسمی ارتباط ندارد (Vestra and Fioretto, 2003). از اینرو، کنترل گلوکز خون به تنهایی برای به‌تعویق انداختن روند نفروپاتی دیابتی کافی نیست. استرس‌های اکسیداتیو توأم با افزایش تولید ماتریکس خارج سلولی (extra cellular matrix; ECM) نیز نقش اساسی در آسیب‌های پاتولوژیک کلیوی دارند (Kalia *et al*., 2004; Cameron *et al*., 2005; Jandeleit-Dahm *et al*., 2005). در بررسی حاضر، کلیه موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان، دچار آسیب‌های سلولی متعددی شده بودند که این آسیب‌ها احتمالاً با آسیب غشاءهای سلولی همراه بوده است که ممکن است در اثر استرس‌های اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی ایجاد شده باشند.

استرس اکسیداتیو ناشی از آنیون‌های سوپراکسید (Superoxide anions) در پاتوفیزیولوژی نفروپاتی دیابتی دخیل می‌باشد (Vural *et al*., 2002). با تجویز نارینژنین به موش‌های دیابتی، تغییر پاتولوژیکی قابل توجهی در بافت کلیه مشاهده نشد که این خود اثرات محافظتی نارینژنین را در مقابل عوارض کلیوی دیابت نشان می‌دهد. بنابراین، محافظت بافت کلیه توسط نارینژنین در دیابت تجربی را علاوه بر اثرات

هیپوگلیسمیک نارینژنین می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس‌های اکسیداتیو آن مربوط دانست.

آسیب مهم دیگری که در کلیه موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان در بررسی حاضر مشاهده شد، افزایش ضخامت غشاهای پایه گلومرولی و ماتریکس مزانژیال بود. افزایش ماتریکس مزانژیال در نفروپاتی دیابتی، در ارتباط با تغییرات ماتریکس خارج سلولی می‌باشد (Yamanea *et al*., 2004). مشخص شده است که در بیماری دیابت، هیدروکسی‌پرولین که از اجزای ویژه کلاژن بافتی است، در کلیه افزایش می‌یابد (Liu *et al*., 2008). افزایش ماتریکس مزانژیال با افزایش سنتز کلاژن نوع ۴ که یکی از اجزاء ماتریکس خارج سلولی در کلیه است، حاصل می‌گردد (Kotajima *et a*l., 2000). مشخص شده است که MMPs (Matrix metalloproteinase) مسئول تجزیه و زوال ماتریکس خارج سلولی هستند و در این میان MMP2 و MMP9 به‌طور اختصاصی مسئول تجزیه و نابودی کلاژن هستند (Midwood *et al*., 2004; Sottile, 2004). در نفروپاتی دیابتی فعالیت MMP2 و MMP9 کاهش می‌یابد که در نهایت به افزایش EMC منجر خواهد شد (Rysz *et al*., 2007). این احتمال وجود دارد که نارینژنین باعث بازگشت فعالیت MMP2 و MMP9 به حالت طبیعی گردیده که مانع از افزایش ماتریکس مزانژیال و در نهایت اسکلروز گلومرولی و فیبروز کلیه‌ها می‌شود. در هر صورت، یافته‌های آسیب‌شناسی این مطالعه در توافق با نشانی‌ها و شواهد، با نتایج بیوشیمیایی به‌دست آمده همخوانی داشته و آن‌ها را مورد تائید قرار می‌دهد.

نتایج بررسی حاضر اثرات فارماکولوژیکی نارینژنین را در مقابل عوارض کلیوی دیابت نشان می‌دهد. بنابراین، پس از انجام کارآزمایی‌های شاهدار اتفاقی و حصول نتایج مثبت، نارینژنین می‌تواند به‌عنوان یک محصول دارویی گیاهی جهت پیشگیری از آسیب‌های کلیوی ناشی از استرس اکسیداتیو موجود در بیماری دیابت، در مورد انسان نیز توصیه گردد. تعیین تاثیر دزهای مختلف نارینژنین و شناخت دقیق، مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی آن نیاز به مطالعات آتی دارد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تبریز جهت اجرای این مطالعه قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

• Alberti, K.G.M.M. and Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation, Diabetes Medicine, 15(7): 539-553.

- Anderson, S., Rennke, H.G., Brenner, B.M., Zayas, M.A., Lafferty, H.M., Troy, J.L., *et al*. (1992). Nifedipine versus fosinopril in uninephrectomized diabetic rats. Kidney International, 41(4): 891-897.
- Annadurai, T., Muralidharan, A.R., Joseph, T., Hsu, M.J., Thomas, P.A. and Geraldine P. (2012). Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. Journal of Physiology and Biochememistry, 68(3): 307-318.
- Annadurai, T., Thomas, P.A. and Geraldine, P. (2013). Ameliorative effect of naringenin on hyperglycemia-mediated inflammation in hepatic and pancreatic tissues of Wistar rats with streptozotocin- nicotinamide-induced experimental diabetes mellitus. Free Radical Research, 47(10): 793-803.
- Arul, D. and Subramanian, P. (2013). Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. Biochemical and Biophysical Research Communications, 434(2): 203-209.
- Aviram, M., Rosenberg, M., Billecke, S., Erogul, J., Sorenson, R., Bisgaier, C.L., *et al*. (1999): Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low-density lipoprotein and preserved by antioxidants. Free Radical Biology and Medicine, 26(7-8): 892-904.
- Bulter, R., Morris, A.D., Belch, J.J.E., Hill, A. and Struthers, A.D. (2000): allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetes with mild hypertension. Hypertension, 35(3): 746-751.
- Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (1996). Enzymes, Teitz fundamentals of clinical chemistry. Philadelphia, USA: NB Saunders Company, pp: 4312-4335.
- Cameron, N.E., Gibson, T.M., Nangle, M.R. and Cotter, M.A. (2005): Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes, Annual New York Academic Science, 1043(1): 784-792.
- Caraway, W.T. (1955). Determination of uric acid in serum by carbonate method. American Journal of Clinical Pathololgy, 25(7): 840-845.
- Cerielo, A., Motz, E., Cavarape, A., Lizzio, S., Russo, A., Quatararo, A., *et al*. (1997): Hyperglycemia counterbalances the antihypertensive effect of glutathione in diabetes patients: evidence linking hypertension and glycemia through the oxidative stress in diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Its Complications, 11(4): 250-255.
- Chance, B., Greenstein, D.S. and Roughton, R.J.W. (1952). The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 37(2): 301-321.
- Chiou G.C.Y. and Xu, X. (2004). Effects of some natural flavonoids on retinal function recovery after ischemic insult in the rat. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 20(2): 107-113.
- Choi E.J. and Ahn, W.S. (2008). Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. Archives of Pharmacal Research, 31(11): 1457-1462.
- Claiborne, A. (1985). Catalase activityIn: Boca Raton FL, editor. CRC Handbook of methods for oxygen radical research. Florida: CRC Press, Boca Raton, pp: 283-284.
- Curtis, S.J., Mortiz, M. and Sondgrass, P.J. (1972). Serum enzyme derived from liver cell fraction and the response of carbon tetrachloride intoxication in rats. Gastroentrology, 62(1): 84-92.
- El-Bassiouni, E.A., Helmy, M.H. Abou Rawash, N. El-Zoghby, S.M., Kamel, M.A. and Abou Rayah, A.N. (2005): Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defense. British Journal of Biomedical Science, 62(2): 71-76.
- Fawcett, J.K. and Scott, J.E. (1960). A rapid and precise method for the determination of urea, Journal of Clinical Pathology, 13(2): 156-159.
- Fraga C.G., Leibouitz B.E. and Toppel A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as TBARS in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes, Free Radical Biology & Medicine, pp: 155-161.

- Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V. and Watal, G. (2005). Hypoglycemic and Antidiabetic Effect of Ethanolic Extract of Leaves of Annona squamosa L. in Experimental Animals. Journal of Ethnopharmacology, 99(1): 75-81.
- Haidari, F., Keshavarz, S.A., Rashidi, MR. and Shahi, M.M. (2009). Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 45(3): 285-291.
- Hirai, S., Kim, Y.I., Goto, T., Kang, MS., Yoshimura, M., Obata, A., *et al*. (2007). Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. Life Science, 81(16):1272-1279.
- Holman, R.R. and Turner, R.C. (1991): Oral agents and insulin in the treatment of NIDDM. In: Pickup, J. and Wiliams, G. Editors, Textbook of Diabetes, Blackwell, Oxford, pp: 467-469.
- Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A.I., Padalko, V.I. and Flora, S.J. (2011). Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(4): 607-614.
- Jandeleit-Dahm, K.A., Lassila, M. and Allen, T.J. (2005): Advanced glycation end-products in diabetes-associated atherosclerosis and renal disease: interventional studies, Annual New York Academic Science, 1043(1): 759-766.
- Jong-Hwa, P., Jin-Woo, L., Hyun-Dong, P., Ssang-Goo, C., Seung-Yeol, N., Yong-Sun, P., *et al*. (2010). Cytotoxic Effects of 7-O-Butyl Naringenin on Human Breast Cancer MCF-7 Cells. Food Science and Biotechnology, 19: 717-724.
- Khan, M.F., Mathur, A., Pandey, V.K. and Kakkar, P. (2022). Naringenin alleviates hyperglycemia-induced renal toxicity by regulating activating transcription factor 4–C/EBP homologous protein mediated apoptosis. Journal of Cell Communication and Signaling, 16(2): 271-291.
- Kalia, K., Sharma, S. and Mistry, K. (2004): Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy, Clinical & Chemical Acta, 347(1-2): 169-176.
- Kameswara Rao, B. and Appa Rao, C.H. (2001). Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of alternifolium (Wt.) Walp. Seed extracts in normal and diabetic rats, Phytomedicine, 8(2): 88-93.
- Kaneto, H., Katakami, N., Kawamori, D., Miyatsoka, T., Sakamoto, K., Matsuoka, T.A., *et al*. (2007): Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. Antioxide Redox Signal, 9(3): 355-366.
- Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E. and Yano, M. (1999). Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(9): 3565-3571.
- Keser, S., Celik, S. and Turkoglu, S. (2013). Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (Vitis vinifera L.) and grape products. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 64(2): 210-216.
- Kinoshita, T., Lepp, Z., Kawai, Y., Terao, J. and Chuman, H. (2006). An integrated database of flavonoids. BioFactors, 26(3): 179-188.
- Kotajima, N., Kimura, T., Kanda, T., Obata, K., Kuwabara, A., Fukumura, Y., *et al*. (2000). Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Journal of Diabetes and its Complications, 14(1): 13-17.
- Lee, J. and Kim, G. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. Journal of Food Science, 75(7): 212-217.
- Lee, G. and Luna, H.T. (1988). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. 3rd ed. New York: Mc Graw-Hill Book Company, pp: 32-107.
- Lil, J.L., Stantman, F.W. and Lardy, H.A. (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. Archives of Biochemistry and Biophysics, 263(1): 150-160.
- Lisa, J., Wilcox, M., Borradaile, W. (1999). Antiatherogenic Properties of Naringenin, a Citrus Flavonoid. Cardiovascular Drug Reviews, 17(2): 160-178.

- Liu, H.R., Tang, X.Y., Dai, D.Z. and Dai, Y. (2008): Ethanol extracts of Rehmannia complex (Di Huang) containing no Corni fructus improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats. Journal of Ethnopharmacology, 118(3): 466-472.
- McGarry, J.D. (1992). What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes, Science, 258(5083): 766-770.
- Midwood, K.S., Williams, L.V. and Schwarzbauer, J.E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 36(6): 1031-1037.
- Miyake, Y., Minato, K. and Fukumoto, S. (2003). New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with Aspergillus saitoi from flavanone glycoside in citrus fruit. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 67(7): 1443-1450.
- Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S.L. and Tiller, D.G. (1984). Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. Cancer Research, 44(11): 5086-5091.
- Mulvihill, E.E., Allister, E.M., Sutherland, B.G., Telford, D.E., Sawyez, C.G., Edwards, J.Y., *et al*. (2009). Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. Diabetes, 58(10): 2198-2210.
- Naik, S.R. (2003). Antioxidants and their role in biological functions: An overview. Indian Drugs, 40(9): 501-12.
- Nalini, N., Aranganathan, S. and Kabalimurthym J. (2012). Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. Toxicology Mechanisms and Methods, 22(5): 397-408.
- Nishikimi, M., Rao, N.A. and Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. Biochemical and Biophysical Research Communications, 46(2): 849-854.
- Noyan, T., Balaharoğlu, R. and Kömüroğlu, U. (2005). The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. Clinical and experimental medicine, 5, pp: 31-36.
- Oršolić, N., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Dikić, D., Prskalo, Z.Š. and Sirovina, D. (2011). DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. European Journal of Pharmacology, 656(1-3): 110-118.
- Ortiz-Andrade, R.R., Sánchez-Salgado, J.C., Navarrete-Vázquez, G., Webster, S.P., Binnie, M., García-Jiménez, S., *et al*. (2008). Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation. Diabetes, Obesity and Metabolism, 10(11): 1097-1104.
- Peerapatdit, T., Patchanas, N., Likidlilid, A., Poldee, S. and Sriratanasathavorn, C. (2006): Plasma lipid peroxidation and antioxidant nutrients in type 2 diabetic patient. Journal of the Medical Association of Thailand, 89(5): 47-55.
- Pollard, S.E., Whiteman, M. and Spencer, J.P.E. (2006). Modulation of peroxynitrite-induced fibroblast injury by hesperetin: a role for intracellular scavenging and modulation of ERK signalling. Biochemical and Biophysical Research Communications, 347(4): 916-923.
- Rahigude, A., Bhutada, P., Kaulaskar, S., Aswar, M. and Otari, K. (2012). Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. Neuroscience, 226: 62-72.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179(4073): 588-90.
- Roy, S., Ahmed, F., Banerjee, S. and Saha, U. (2016). Naringenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic rat renal impairment by downregulation of TGF-β1 and IL-1 via modulation of oxidative stress correlates with decreased apoptotic events. Pharmaceutical Biology, 54(9): 1616-1627.

- Rozenberg, O., Shiner, M., Aviram, M. and Hayek, T. (2008): Paraoxonase 1 (PON1) attenuates diabetes development in mice through its antioxidative properties, Free Radical Biology and Medicine, 44(11): 1951-1959.
- Rysz, J., Banach, M., Stolarek, R.A., Pasnik, J., Cialkowska-Rysz, A., Koktysz, R., *et al*. (2007). Serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and metalloproteinase tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in diabetic nephropathy. Journal of Nephrology, 20(4): 444-452.
- Signorini, A.M., Fondelli, C., Renzoni, E., Puccetti, C., Gragnoli, G. and Giorgi, G. (2002). Antioxidant effect of gliclazide, glibenclamide and metformin in patients with type 2 diabetes mellitus, Current Therapeutic Research, 63(7): 411-420.
- Sottile, J. (2004). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1654(1): 13-22.
- Srivastava, Y., Bhat, H.V., Verma, Y. and Venkaidh, K. (1993). Antidiabetic and adaptogenic properties of Momordica charantia extract: an experimental and clinical evaluation, Phytotherapy Research, 7(4): 285-288.
- Suresh, R.N. and Vandana, S.P. (2008). Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome® in rifampicin induced liver injurym in rats: Evidence of antioxidant activity. Fititerapia, 79(6): 439-445.
- Tas, S., Sarandol, E., Ziyanok-Ayvalik, S., Ocak, N., Serdar, Z. and Dirican, M. (2006): Vanadyl sulphate treatment improves oxidative stress and increases serum paraoxonase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutrition Research, 26(12): 670-676.
- Teitz, N.W. (1987). Fundamentals of Clinical Chemistry. Philadelphia: NB Saunders Company, pp: 638.
- Vestra, M.D. and Fioretto, P. (2003): Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients, Internatrional Congress Series, 1253: 163-169.
- Vural, P., Cevik, A., Curgunlu, A. and Canbaz, M. (2002): Effects of diabetes mellitus and acute hypertension on plasma nitricoxide and endothelin concentrations in rats, Clinical & Chemical Acta, 320(1-2): 43-47.
- Wohaieb, S.A. and Godin, D.V. (1987). Alterations in free radical tissue defense mechanism in STZ induced diabetes in rat, effects of insulin treatment, Diabetes, 36(9): 1014-1018.
- Yamanea, T., Maedaa, T., Yamamotoc, Y., Nishic, K., Asanof, M., Shirahama-Nodaf, K., *et al*. (2007). Legumain/asparaginyl endopeptidase controls extracellular matrix remodeling through the degradation of fibronectin in mouse renal proximal tubular cells. FEBS Letters, 581(7): 1417-1424.
- Yan, N., Wen, L., Peng, R., Li, H., Liu, H., Peng, H., *et al*. (2016). Naringenin ameliorated kidney injury through Let-7a/TGFBR1 signaling in diabetic nephropathy. Journal of Diabetes Research, Article ID: 8738760.
- Yong-Gui, W.u., Hui Lin, Xiang-Ming. Q.i., Guo-Zhong, W.u., Hao Qian, Min Zhao, Ji-jia Shen. and Shan-Tan, Lin. (2006). Prevention of early renal injury by mycophenolate mofetil and its mechanism in experimental diabetes. International Immunopharmacology; 6(3): 445-453.
- Zbarsky, V., Datla, K.P., Parkar, S., Rai, D.K., Aruoma, O.I. and Dexter, D.T. (2005). Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. Free Radical Research, 39(10): 1119-1125.