تأثیر اولئوروپین بر وضعیت استرس اکسیداتیو بافت کلیه و برخی فاکتورهای التهابی سرم در موش صحرایی نر دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین

دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

نگین امیراشجعی اسالمی[۱]، محمدرضا نصیرزاده[۲*]، جعفر رحمانی کهنمویی[۳]

۱. دانشجوی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران ۲. استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاداسلامی، تبریز، ایران ۳. استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: استرس اکسیداتیو کلیوی در آغاز و پیشرفت بیماری کلیوی ناشی از دیابت نقش حیاتی دارد. هدف این مطالعه تعیین اثر اولئوروپین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت کلیه و برخی فاکتورهای التهابی سرم در موش‌های صحرایی نر دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تعداد ۲۸ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۳۰ ±۱۹۰ گرم به‌صورت تصادفی انتخاب و به ۴ گروه (n =۷) گروه کنترل، گروه دیابتی، گروه تیمار و گروه اولئوروپین تقسیم شدند. دیابت از طریق تزریق تک دوز استرپتوزوتوسین به میزان ۶۰mg/kg به رت‌ها القا شد. رت‌های گروه اولئوروپین و تیمار، اولئوروپین را با دوز ۶۰ mg/kg روزانه از طریق گاواژ معدی به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند. در پایان دوره مطالعه، غلظت سرمی اوره، کراتینین، گلوکز، اینترلوکین-۱(IL-1)، اینترلوکین-۶ (IL-6) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپراکسید دسموتاز (SOD) گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و سطح مالون دی آلدهید (MDA) بافت کلیه اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که غلظت سرمی گلوکز، اوره، کراتینین، اینترلوکین-۱ و اینترلوکین-۶ در حیوانات دیابتی‌شده به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است (p<۰/۰۰۱). همچنین، فعالیت آنزیم‌های SOD, GPX و میزان TAC بافت کلیه در گروه تیمار در مقایسه با گروه دیابتی‌شده به‌طور معنی‌داری افزایش و سطح MDA بافت کلیه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که اولئوروپین خوراکی قادر است قند خون، استرس اکسیداتیو و IL-1 و IL-6 را کاهش دهد. این اثرات شاید به دلیل توانایی آن در تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی باشد.

کلیدواژه‌ها: اولئوروپین، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، کلیه، دیابت، موش صحرایی

***نویسنده مسئول:** استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاداسلامی، تبریز، ایران

ایمیل: mr.nasirzadeh@iaut.ac.ir **تلفن:** ۰۹۱۴۱۰۱۵۱۰۸ **نمابر:** ۰۴۱۳۶۳۷۳۹۳۵

مقدمه

دیابت شیرین یا ملیتوس یک اختلال اندوکرینی است که به دنبال نقص در تولید انسولین و یا اختلال در مصرف انسولین توسط بدن ایجاد می‌گردد و یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته است (۱). افزایش استرس اکسیداتیو و تغییر میزان آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پاتوژنز دیابت ملیتوس ایفا می‌کند (۲). مکانیسم‌هایی که دیابت موجب آسیب کلیوی می‌شود پیچیده هستند و به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. اما استرس اکسیداتیو کلیوی در آغاز و پیشرفت بیماری کلیوی ناشی از دیابت نقش حیاتی دارد (۳). هرچند عوامل ژنتیکی، چاقی و کم‌تحرکی نقش مهمی در ابتلای فرد به دیابت دارند، با این وجود، تجمع ماتریکس خارج سلولی، استرس اکسیداتیو و التهاب بافتی همگی مسئول تغییرات معمول در نفروپاتی دیابتی می‌باشند (۱، ۴). تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد باعث آسیب بیومولکول‌هایی مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA می‌شود. آسیب اکسیداتیو این مولکول‌ها به تدریج به بیماری‌های مزمن از قبیل دیابت، تصلب شرائین، پیری و سرطان منجر می‌شود. دیابت تمامی اعضای بدن انسان از جمله چشم، کلیه، کبد و سیستم عصبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). وجود آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین E و فلاونوئیدها در جیره غذایی می‌تواند اثرات حفاظتی در بیماران دیابتیک داشته باشد (۶). عدم کنترل دیابت منجر به عوارض دیابت می‌شوند که عامل افزایش هزینه‌های پزشکی و کاهش کیفیت زندگی هستند.

امروزه استفاده از داروهای گیاهی به دلیل تأثیر مثبت، عوارض جانبی کمتر و هزینه نسبتا پایین رو به گسترش است، لذا تحقیق بر روی گیاهان دارویی حائز اهمیت فراوانی است. استفاده از طب گیاهی برای درمان بیماری دیابت در دنیا اهمیت فراوانی پیدا کرده‌است (۷). بیشترین ترکیبات فعال موجود در میوه‌ها، سبزیجات و گیاهان دارویی ترکیبات فنلی، نیتروژنی، ویتامین‌ها، ترپنوئیدها (کاروتنوئیدها و تری‌ترپن‌ها) و آلکالوئیدها هستند که برخی از آنها فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی دارند. آنتی‌اکسیدان‌ها در حیات انسان نقش مهم و اساسی ایفا می‌کنند. به طوری که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش خطر بیماری‌های قلبی، دیابت و دیگر بیماری‌های مرتبط با پیری از قبیل سرطان همراه است (۸). برگ زیتون یک منبع قابل ملاحظه ترکیبات فنلی است که به لحاظ بیولوژیکی فعال هستند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و قدرت پاک‌کنندگی رادیکالی بهتری دارند (۹، ۱۰). همچنین ترکیبات فنلی مشتق از برگ و روغن زیتون با داشتن مقادیر قابل توجهی اولئوروپین (Oleuropein) از اکسیداسیون لیپوپروتئینی جلوگیری می‌کنند (۱۱). اولئوروپین یک ترکیب فنلی است که به لحاظ فارماکولوژیکی فعال‌ترین ماده موجود در روغن زیتون است (۱۲). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان اولین خط دفاعی را در برابر رادیکال‌های آزاد تشکیل می‌دهند؛ از جمله سوپراکسید دسموتاز (SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) که نقش مهمی در پاک‌کردن متابولیت‌های سمی ایفا می‌کنند (۱۳). مالون دی‌آلدهید (MDA) فراورده اصلی پراکسیداسیون است و افزایش میزان آن شاخص مهم پراکسیداسیون چربی است (۱۴). طی مطالعه‌ای نشان داده‌شده که اولئوروپین قادر است سمیت کلیوی ناشی از کادمیوم را کاهش دهد. در این مطالعه اولئوروپین توانست سطح ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان GPX, SOD و میزان MDA بافت کلیه را به‌طور معنی‌داری بهبود بخشد. همچنین مشخص گردید اولئوروپین از افزایش سطح سرمی اوره و کراتینین جلوگیری می‌کند. اوره و کراتینین شاخص‌های عملکرد طبیعی کلیه هستند (۱۵). در مطالعه دیگری مشخص گردید اولئوروپین می‌تواند پاسخ التهابی، اکسیداتیو و آپوپتوتیک را در موش صحرایی مبتلا به نارسایی حاد کلیوی تضعیف نماید (۱۶). علاوه بر این، در مطالعه‌ای گزارش شده‌است که اولئوروپین می‌تواند با داشتن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوزی آسیب کلیوی ناشی از ایسکمی- بازخون‌رسانی را کاهش دهد (۱۷). التهاب مزمن با شدت کم و واکنش ذاتی سیستم ایمنی با پاتوژنز دیابت ارتباط نزدیکی دارد و غلظت پلاسمایی فاکتورهای التهابی در افراد دیابتی افزایش می‌یابد (۱۸). افزایش استرس اکسیداتیو باعث افزایش سیتوکین‌های التهابی می‌گردد و با افزایش سیتوکین‌ها نیز تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد (۱۹). همچنین نشان داده‌شده که اولئوروپین اثرات آنتی‌اکسیدان، ضد التهابی و ضد سرطانی دارد و قادر است در شرایط invitro از اکسیداسیون لیپیدی جلوگیری نماید (۲۰، ۲۱). مطالعه صورت‌گرفته توسط Karabag-Coban در سال ۲۰۱۷ اثرات تزریق داخل صفاقی اولئوروپین با دز ۲۰ mg/kg را بر وضعیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی در موش صحرایی دیابتی شده بررسی نموده‌است (۱۴). در حالی‌که، از یک سو، مصرف بالای روغن زیتون در رژیم غذایی مدیترانه‌ای

و اثرات مفید آن بر سلامتی به‌خوبی شناخته شده‌است و از سویی دیگر، در سال‌های اخیر توجه زیادی به فلور میکروبی روده شده‌است، به‌طوری که به‌عنوان یک عضو متابولیک توصیف می‌شود که بر تغذیه میزبان تأثیر می‌گذارد و ممکن است فراهمی زیستی و دسترسی زیستی ترکیبات فنلی زیتون را از طریق تبدیلشان به سایر ترکیبات فعال تحت تأثیر قرار دهد (۱۲). با توجه به اینکه تاکنون، تأثیر اولئوروپین خوراکی بر وضعیت استرس اکسیداتیو کلیه به‌دنبال دیابت القاءشده با استرپتوزوتوسین بررسی نشده‌است، در مطالعه حاضر اثر محافظتی اولئوروپین خوراکی بر وضعیت استرس اکسیداتیو بافت کلیه و برخی فاکتورهای التهابی سرم در موش صحرایی نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

نوع مطالعه

پژوهش حاضر از نوع تجربی است. در این مطالعه تعداد ۲۸ سر رت نر نژاد ویستار با وزن۳۰ ±۱۹۰ گرم به‌صورت تصادفی انتخاب و به ۴ گروه (n =۷) تقسیم شدند. موش‌های صحرایی مورد مطالعه در شرایط یکسان با دسترسی آزاد به آب و غذا و در سطحی با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه نوری ۱۲/۱۲ روشنایی– تاریکی و به‌صورت پنج حیوان در هر قفس نگهداری شدند. گروه یک (کنترل): موش‌های صحرایی سالم، با دسترسی آزاد به آب و جیره پایه. گروه دو (دیابتی): موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با دسترسی آزاد به آب و جیره پایه. گروه سه (تیمار): موش‌های صحرایی دیابتی‌شده به همراه تجویز اولئوروپین با دسترسی آزاد به آب و جیره پایه. گروه چهار (اولئوروپین): موش‌های صحرایی سالم به همراه تجویز اولئوروپین با دسترسی آزاد به آب و جیره پایه. برای ایجاد دیابت حیوانات گروه دوم و سوم داروی استرپتوزوتوسین به میزان ۶۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی و تک دوز دریافت کردند (۲۲). حیوانات گروه چهارم اولئوروپین را به میزان ۶۰ mg/kg روزانه از طریق گاواژ معدی به مدت ۳۰ روز دریافت نمودند (۲۳). در پایان دوره مطالعه نمونه خون و بافت کلیه از حیوانات گروه‌های مختلف اخذ و سطح سرمی فاکتورهای التهابی، قند خون، شاخص پراکسیداسیون چربی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت کلیه اندازه‌گیری شد.

طرز تهیه اولئوروپین

برای تهیه اولئوروپین، ابتدا دانه‌های میوه زیتون رقم کنسروی ماری برداشت شد. پس از هسته‌گیری و شستشوی کامل در آب مقطر قرار داده‌شد و بعد از ۲۴ ساعت، آب به‌دست آمده توسط لیوفیلیزاتور خشک گردید. با استفاده از HPLC پرپراتیو (preparative) نسبت به ریتنشن تایم (Retention Time) ۱۸ به‌صورت اتوماتیک جداسازی و خالص‌سازی شد. خلوص آن با استفاده از استاندارد اولئوروپین (Sigma Aldrich) مورد سنجش قرار گرفت. در پایان دوره مطالعه حیوانات با استفاده از داروی کتامین (۴۰ mg/kg) و زایلازین (۸ mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی تحت بیهوشی جراحی قرار گرفته و نمونه خون از طریق سینوس چشمی جمع‌آوری شد (۲۴). برای جداسازی سرم نمونه‌ها با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و تا اندازه‌گیری فاکتورهای سرمی در فریزر ۲۰- نگهداری گردید. پس از اخذ نمونه خون محوطه شکمی باز و کلیه راست حیوان برداشته و بلافاصله با سرم نرمال سالین شسته شد. کلیه راست در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده کردن نمونه بافتی: پس از شستشوی نمونه بافتی با استفاده از بافر فسفات (PBS, PH=7.4) ۱ گرم از بافت کلیه در ۵ میلی‌لیتر بافر سرد (Tris-Hcl 50 mM, PH=7.5, EDTA 5mM, DTT 1mM) هموژنیزه شد. سپس محلول حاصل با سرعت ۱۰،۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی حاصل برای ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و شاخص پراکسیداسیون چربی و ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بافت کلیه مورد استفاده قرار گرفت.

مطالعه بیوشیمیایی

اندازه‌گیری قندخون: مقادیر سرمی قند خون ناشتا هم در ابتدای مطالعه و هم در پایان دوره مطالعه با استفاده از دستگاه گلوکومتر (AccuaChek, USA) اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از القای دیابت ۷۲ ساعت پس از تزریق استرپتوزوتوسین سطح سرمی گلوکز اندازه‌گیری شد و حیواناتی که قند خون بالای ۳۰۰ mg/dl داشتند، به‌عنوان مدل دیابت انتخاب شدند (۲۵).

اندازه‌گیری فاکتورهای التهابی: IL-1 و IL-6 (بر اساس الیزا بر پایه تفکیک رقابتی با استفاده از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال) با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت Diaclone, France و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شدند.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت کلیه: فعالیت آنزیم‌های SOD و GPX با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت Cayman CHEMICAL,USA و سطح TAC و MDA با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت CELLBIOLABS, INC,USA اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری سوپراکسید دسموتاز: از گزانتین و گزانتین اکسیداز جهت تولید رادیکال‌های سوپراکسید استفاده می‌شود. این رادیکال‌ها با I.N.T یا 5-(4-nitrophenol)-3-(iodophenyl) phenyltetrazolium chloride-2 واکنش می‌دهند و رنگ قرمز فورمازون تولید می‌کنند که در طول موج ۵۰۵ nm اندازه‌گیری می‌شود (۲۶).

اندازه‌گیری گلوتاتیون پراکسیداز: آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز واکنش اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) توسط کومن هیدروپراکسید را کاتالیز می‌نماید. در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH، گلوتاتیون اکسیدشده (GSSG) مجدداً به گلوتاتیون احیاء تبدیل می‌شود که این احیاء با اکسیداسیون همزمان NADPH به $NADP^+$ همراه است. در این واکنش کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (۲۶).

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید: این روش بر پایه واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBARS)، اندازه‌گیری جذب با روش اسپکتروفتومتری و مقایسه با منحنی استاندارد می‌باشد (۲۶).

اندازه‌گیری ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی: ABTS (2, 2-Azino-di-{3-ethylbenzthiazoline sulphonate}) با یک پراکسیداز و آب اکسیژنه مجاور می‌شود تا رادیکال‌های ABTS+ تولید نماید. این ماده، رنگ آبی–سبز دارد که در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه تولید این رنگ را تضعیف می‌کنند. کلیه این فاکتورها مطابق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شدند (۲۷).

آنالیز آماری

در این مطالعه داده‌های به‌دست آمده با استفاده از روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی دانکن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌دار در این مطالعه $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. همه مراحل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گرفت.

نتایج

بررسی آماری داده‌های مربوط به میانگین وزن حیوانات در آغاز مطالعه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین حیوانات در گروه‌های مختلف وجود ندارد ($p>۰/۰۵$). در حالی‌که در انتهای دوره، وزن حیوانات دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته‌است ($p<۰/۰۰۱$). همچنین مشخص گردید بین گروه تیمار و دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۰۱$). اما اختلاف بین گروه کنترل و اولئوروپین معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) (جدول۱). آنالیز داده‌های مربوط به گلوکز خون نشان داد که میانگین گلوکز خون در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته‌است ($p<۰/۰۰۱$). همچنین بین گروه دیابتی با تیمار نیز تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۰۱$). اما اختلاف بین گروه کنترل و اولئوروپین معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) (جدول۱).

مقایسه آماری مربوط به میانگین غلظت سرمی اوره و کراتینین مشخص نمود که غلظت اوره و کراتینین در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۰۱$). در صورتی که در گروه تیمار در مقایسه با گروه دیابتی غلظت سرمی اوره و کراتینین کاهش معنی‌داری دارد ($p<۰/۰۰۱$). چنانچه بین گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار تفاوت معنی‌داری از نظر شاخص کراتینین وجود ندارد ($p>۰/۰۵$). اما اختلاف بین گروه کنترل و اولئوروپین معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) (جدول۱).

جدول ۱. میانگین وزن، سطح گلوکز، اوره و کراتینین موش‌های صحرایی نر در گروه‌های مختلف (Mean±SEM)

گروه / فاکتور	کنترل	دیابتی شده	تیمار	اولئوروپین	مقدار P
وزن بدن قبل (گرم)	۱۶۹/۳±۱۴/۰۹a	۱۷۵/۲±۰۰/۷۰a	۱۷۰/۳±۴۳/۲۳a	۱۷۰/۶۹±۵۷/a	۰/۵۳
وزن بدن بعد (گرم)	۱۸۸/۴±۷۱/۵۳a	۱۴۴/۴±۵۰/۱۴c	۱۶۴/۳±۸۶/۱۳b	۱۸۶/۴±۵۷/۵۳a	<۰/۰۰۱
گلوکز قبل (میلی‌گرم/ دسی لیتر)	۸۶/۲±۳۶/۷۸a	۸۷/۳±۵۰/۲۳a	۸۶/۴±۷۱/۱۰a	۸۵/۲±۵۰/۶۶a	۰/۹۷۸
گلوکز بعد (میلی‌گرم/ دسی لیتر)	۸۴/۴±۱۴/۴۴c	۳۷۹/۱۱±۴۳/۵۴a	۲۱۴/۱۲±۷۱/۲۵b	۸۶/۴±۵۷/۳۷c	<۰/۰۰۱
اوره (میلی‌گرم/ دسی لیتر)	۲۴/۰±۵۷/۵۷c	۴۰/۱±۴۳/۴۴a	۳۰/۱±۰۰/۱۱b	۲۲/۰±۱۴/۵۰۸c	<۰/۰۰۱
کراتینین (میلی‌گرم/ دسی لیتر)	۱/۰±۳۶/۱۱۲b	۲/۰±۴۲/۹۱۰a	۱/۰±۶۱/۰۶۷b	۱/۰±۴۶/۰۹۷b	<۰/۰۰۱

حروف نامشابه در هر ردیف نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها هست. سطح معنی‌دار $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شده‌است. وزن بدن بعد: $p<۰/۰۰۱$ c اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار، b $p<۰/۰۰۱$ اختلاف معنی‌دار گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی. گلوکز بعد: $p<۰/۰۰۱$ a اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار، b $p<۰/۰۰۱$ اختلاف معنی‌دار گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی. اوره: $p<۰/۰۰۱$ a اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار، b $p<۰/۰۰۱$ اختلاف معنی‌دار گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی. کراتینین: $p<۰/۰۰۱$ a اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار.

مقایسه میانگین سطح MDA در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافته‌است ($p<۰/۰۰۱$). همچنین مشخص گردید در گروه تیمار در مقایسه با گروه دیابتی سطح MDA به‌طور معنی‌داری کاهش یافته‌است ($p<۰/۰۰۱$). اما اختلاف بین گروه کنترل و اولئوروپین معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) (جدول۲).

همچنین مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD,GPX وTAC در گروه‌های مختلف مورد مطالعه مشخص نمود که میزان فعالیت این آنزیم‌ها در گروه دیابتی به‌طور معنی‌داری کاهش یافته‌است ($p<۰/۰۰۱$). علاوه بر این، مشخص گردید میزان فعالیت این فاکتورها در گروه تیمار نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی‌داری دارد. ($p<۰/۰۰۱$). اما اختلاف بین گروه کنترل و اولئوروپین معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) (جدول۲).

مقایسه غلظت سرمی IL-1 و Il-6 در حیوانات گروه‌های مختلف مشخص نمود که غلظت سرمی این فاکتورها در گروه دیابتی نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش یافته‌است ($p<۰/۰۰۱$). همچنین مشخص گردید غلظت سرمی این فاکتورها در گروه تیمار در مقایسه با گروه دیابتی کاهش معنی‌داری داشته‌است ($p<۰/۰۰۱$). اما اختلاف بین گروه کنترل و اولئوروپین معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) (جدول۲).

جدول ۲. میانگین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بافت کلیه، اینترلوکین-۱و ۶ موش‌های صحرایی نر در گروه‌های مختلف (Mean±SEM)

گروه / فاکتور	کنترل	دیابتی شده	تیمار	اولئوروپین	مقدارP
مالون دی آلدئید (نانومول/ میلی گرم پروتئین)	۲/۰±۱۴/۰۳۰c	۳/۰±۶۸/۱۵a	۲/۰±۶۶/۰۹b	۲/۰±۱۶/۰۳۹c	<۰/۰۰۱
سوپراکسید دسموتاز (واحد/ میلی گرم پروتئین)	۵/۰±۳۲/۰۱a	۳/۰±۹۹/۰۸c	۴/۰±۶۴/۱b	۵/۰±۵۲/۱۰۱a	<۰/۰۰۱
گلوتاتیون پراکسیداز (واحد/ میلی گرم پروتئین)	۴۸/۰±۷۹/۱۱a	۴۶/۰±۴۷/۲۵c	۴۷/۰±۵۱/۲۰b	۴۸/۰±۶۹/۱۶۱a	<۰/۰۰۱
ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (میلی مول/ میلی‌گرم)	۳/۰±۳۱/۰۷a	۲/۰±۳۹/۰۷۸c	۲/۰±۸۹/۱۲b	۳/۰±۴۵/۰۸۹a	<۰/۰۰۱
اینترلوکین-۱ (پیکوگرم/ میلی لیتر)	۱۶۲/۱±۱۹/۸۰c	۲۰۷/۲±۰۴/۹۰a	۱۸۳/۲±۰۴/۰۴b	۱۵۸/۲±۳۸/۳۳c	<۰/۰۰۱
اینترلوکین-۶ (پیکوگرم/ میلی لیتر)	۲۴۷/۲±۱۷/۲۵c	۳۴۳/۲±۰۹/۶۳a	۲۸۵/۳±۹۰/۱۱b	۲۵۴/۱±۰۹/۶۷c	<۰/۰۰۱

حروف نامشابه در هر ردیف نشانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها است. سطح معنی‌دار p<۰/۰۵ در نظر گرفته شده‌است. a نشانگر بیشترین مقدار، b حد واسط و c کمترین مقدار است. MDA : a p<۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار، p<۰/۰۰۱ b اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی. SOD : c p<۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار، p<۰/۰۰۱ b اختلاف معنی‌دار گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی. GPX : c p< ۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار، p< ۰/۰۰۱ b اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی. TAC: c p<۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل ، اولئوروپین و تیمار، p<۰/۰۰۱ b اختلاف معنی‌دار گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی. IL-1 و IL-6 : p<۰/۰۰۱، a اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار، p<۰/۰۰۱، b اختلاف معنی‌دار با گروه‌های کنترل، اولئوروپین و دیابتی.

بحث

در تحقیق حاضر شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سوپر اکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و نیز ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بافت کلیه، فاکتورهای التهابی سرم شامل IL-1 وIL-6، قند خون و غلظت اوره و کراتینین سرم اندازه‌گیری شد. موافق با یافته‌های دیگران تزریق استرپتوزوتوسین با تخریب سلول‌های بتا موجب افزایش قند خون و کاهش وزن حیوانات به‌طور معنی‌داری در گروه دیابتی شد (۲۸، ۲۹). در صورتی که تجویز اولئوروپین باعث کاهش قند خون و از دست‌دادن وزن شد. در حالی‌که در گروه تیمار در مقایسه با گروه دیابتی شده اولئوروپین از کاهش وزن و افزایش گلوکز خون به‌طور معنی‌داری جلوگیری نمود. آسیب کلیوی یکی از عوارض اصلی دیابت القا شده با استرپتوزوتوسین در مدل‌های تجربی است که موجب افزایش سطح اوره و کراتینین خون به‌عنوان شاخص‌های عملکرد کلیه می‌گردد (۱۴، ۱۵). در تحقیق حاضر غلظت سرمی اوره و کراتینین در گروه تیمار به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی‌شده کاهش یافت چنانچه بین گروه‌های کنترل، اولئوروپین و تیمار تفاوت معنی‌داری از نظر شاخص کراتینین وجود نداشت. این موضوع نشان می‌دهد که اولئوروپین اثرات محافظت کلیوی دارد و بدین ترتیب آسیب کلیوی را کاهش می‌دهد. فاکتورهای ایمنی و التهابی نقش مهمی در تکامل و پیشرفت آسیب کلیوی ناشی از دیابت دارند (۱۶). طی مطالعه‌ای نشان داده‌اند که اولئوروپین پاسخ‌های التهابی را در بافت کلیه به دنبال سمیت گلیسیرول کاهش می‌دهد. مطالعات چندی گزارش کرده‌اند که اولئوروپین اثرات ضد التهابی خود را ازطریق تضعیف تولید و فعالیت چندین میانجی التهاب از جمله TNF,IL-1 و NOS2 و کاهش فعالیت میلوپراکسیداز انجام می‌دهد (۳۰). در بسیاری از بیماری‌های مزمن از قبیل دیابت شیرین، آترواسکلروزیس و بیماری سیستم ایمنی به دلیل هیپرگلیسمی مزمن، استرس اکسیداتیو بالایی

وجود دارد که موجب تخلیه سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. Hazman و همکاران طی مطالعه‌ای نشان داده‌اند که سمیت ناشی از گلوکز موجب تخریب و آسیب کلیوی می‌شود (۲۸). در مطالعه حاضر تجویز اولئوروپین خوراکی موجب کاهش معنی‌دار فاکتورهای التهابی IL-1 و IL-6 در گروه تیمار در مقایسه با گروه دیابتی گردید. این یافته‌ها با نتایج مطالعه Karabag-Coban همخوانی دارد (۱۴).

در این مطالعه سطح MDA بافت کلیه در گروه دیابتی‌شده در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در حالی‌که میزان این شاخص در گروه تیمار با دریافت اولئوروپین خوراکی به میزان ۶۰ mg/kg در روز به مدت ۳۰ روز به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی‌شده کاهش یافت. MDA فراورده اصلی پراکسیداسیون بوده و افزایش آن شاخص مهم پراکسیداسیون چربی است. کاهش MDA در گروه تیمار را می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی اولئوروپین نسبت داد که می‌تواند با خنثی‌کردن گونه‌های فعال اکسیژن و با به دام انداختن رادیکال‌ها قبل از رسیدن به اهداف سلولی خود عمل نماید (۱۴، ۱۶). علاوه بر این، موافق با یافته‌های قبلی، دیابت موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD و GPX در بافت کلیه گردید که احتمالا به دلیل استرس اکسیداتیو و افزایش بیش از حد رادیکال‌های آزاد است (۲۵). اما اولئوروپین توانست فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD و GPX بافت کلیه حیوانات گروه تیمار را بهبود بخشد. این اثر نشانگر توانایی اولئوروپین در برداشت گونه‌های واکنشی اکسیژن ناشی از دیابت می‌باشد. در این مطالعه میزان TAC نیز ارزیابی شد. نتایج مشخص نمود که میزان TAC در بافت کلیه حیوانات گروه دیابتی نسبت به کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته‌است. در صورتی‌که سطح TAC در گروه تیمار در مقایسه با گروه دیابتی‌شده به‌طور معنی‌داری پایین آمده‌است. این یافته با سایر نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. همچنین، این یافته‌ها با نتایج مطالعه صورت گرفته توسط Karabag-Coban در سال ۲۰۱۷مطابقت دارد (۱۴).

در مطالعهKarabag-Coban و همکاران اولئوروپین به میزان ۲۰ mg/kg و به‌صورت داخل صفاقی به مدت ۲۸ روز استفاده شده‌است. در حالی‌که در مطالعه حاضر از اولئوروپین با دز ۶۰ mg/kg به‌صورت خوراکی به مدت ۳۰ روز استفاده شد (۱۴). اولئوروپین در دستگاه گوارش و توسط فلور میکروبی به ترکیبات بیولوژیکی فعال همچون هیدروکسی تیروزول تبدیل می‌شود. علیرغم فراهمی زیستی پائین اولئوروپین چندین مطالعه بالینی گزارش کرده‌اند که پس از تجویز این ترکیب به مدت سه هفته اثرات مفید آن ظاهر شد (۱۲). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تیمار موش صحرایی دیابتی‌شده با اولئوروپین تعادل اکسیدان–آنتی‌اکسیدان در بافت کلیه را به نفع آنتی‌اکسیدان تغییر می‌دهد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که اولئوروپین قادر است با جلوگیری از افزایش اوره و کراتینین و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بافت کلیه را در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت محافظت نماید و از افزایش سطح سرمی فاکتورهای التهابی IL-1 و IL-6 در موش صحرایی دیابتی‌شده جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کلیه عزیزانی که در اجرای این پژوهش نهایت همکاری را داشتند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند. پروپوزال این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تأیید شده‌است (کد اخلاق IR.IAU.TABRIZ.REC.1400.075). این مقاله، از پایان نامه دکترای حرفه‌ای نویسنده اول، در گروه فیزیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز استخراج شده‌است و هیچ کمک مالی خاصی از سوی سازمان‌های تأمین مالی دریافت نکرده‌است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

References

1. Risbridger G, Wang H, Young P, Kurti T, Wang YZ, Lubahn D, et al. Evidences that epithelial and mesenchymal estrogen receptoralpha mediates effects of estrogen on prostatic epithelium. Developmental Biology. 2001;229(2): 432-42.

2. Baynes J, Thorpe S. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. Diabetes. 1999;48(1):1-9.

3. Jay C, Jha, Claudine B, Bryna SMC, Mark EC, Karin JD. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. Antioxid Redox Signaling. 2016;25(12):657-84.

4. Kim JS, Lee YH, Kim JC, Ko YH, Yoon CS, Yi HK. Effect of exercise training of different intensities on anti-inflammatory reaction in streptozotocin induced diabetic rats. Biology of Sport. 2014;31(1):73-9.

5. Keith KG, Fonseca V, Tan MH, Dalpiaz A. Narrative review: Hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. Annals of Internal Medicine. 2001;141(12):946-56.

6. Morrison J, Dhanasekaran S, Sheen Frampton C, Mensah-Brown E. The effect of Streptozotocin-induced diabetes on the rat seminal vesicle: A possible pathophysiological basis for disorders of ejaculation. Annals of New York Academy. Science. 2006;1084:267-79.

7. Anup KM, Smriti T, Zabeer A, Ram KS. Antidiabetic and antihhyperlipidemic effect of Euphorbia hirta in Streptozotocin induced diabetic rats. Scholars Research Library. 2012;4(2):703-7.

8. Özlem S, Aslan T, Tülay AÇ. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of extracts from medicinal plant Euphorbia platyphyllos L. Journal of Medicinal Plants Research. 2013;7(19):1293-304.

9. Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. Science Pharmacology. 2010;30;78(2):133-54.

10. Lee OH, Lee BY, Lee J, Lee HB, Son JY, Park CS, et al. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. Bioresource Technology. 2009;100(23):6107-13.

11. Omar SH. Cardio protective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. Saudi Pharmaceutical Journal. 2011;18(3):111-21.

12. Nediani C, Ruzzolini J, Romani A, Calorini L. Oleuropein, a Bioactive Compound from Olea europaea L., as a potential preventive and therapeutic agent in non-communicable diseases. Antioxidants. 2019;8(12):578.

13. Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierres J, et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Biochimie. 2012;94(2):374-83.

14. Karabag-Coban F, Hazman O, Bozkurt MF, Ince S. Antioxidant status and anti-inflammatory effects of oleuropein in Streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. European Journal of Medicinal Plants. 2017;18(2):1-10

15. Jemai H, Feryéni A, Mahmoud A, Fki I, Bouallagui Z, Sayadi S. Oleuropein protects kidney against oxidative and histopathological damages in sub chronic cadmium intoxicated mice. Indian Journal of Experimental Biology. 2019;57(8):602-9.

16. Min Y, Nan J, Lihua, Ziyuan N, Ashraf Y A, Mohamed S O, et al. Oleuropein suppresses oxidative, inflammatory, and apoptotic responses following glycerol-induced acute kidney injury in rats. Life Sciences. 2019.232:116634.

17. Nasrallah H, Aissa I, Slim C, Boujbiha MA, Zaouali MA, Bejaoui M, et al. Effect of oleuropein on oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by ischemia-reperfusion injury in rat kidney. Life Sciences. 2020; 255:117833.

18. Donate-Correa J, Martín-Núñez E, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. Inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. Journal of Diabetes Research. 2015; 2015:948417.

19. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic ephropathy. Cardiovascular Therapeutics. 2012;30(1): 49-59.

20. Karabag-Coban F, Hazman O, Bozkurt MF, Ince S. Antioxidant status and anti-inflammatory effects of oleuropein in Streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. European Journal of Medicinal Plants. 2017;18(2):1-10.

21. Ahmadvand H, Noori A, Ghasemi Dehnoo M, Bagheri S, Cheraghi R. Hypoglycemic, hypolipidemic and antiatherogenic effects of oleuropein in alloxan-induced type 1 diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2014;4(1):421-25.

22. Sangi SMA, Ibrahim SM, Fawzy AM, Elsamoual IAE, Shaker A. Antihyperglycemic effect of thymoquinone and oleuropein, on streptozotocin-induced diabetes mellitus in experimental animals. Pharmacognozy Magazine. 2015;11(2):251-7.

23. Nekooeian AA, Khalili A, Khosravi MB. Oleuropein offers cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension. Indian Journal of Pharmacology. 2014;46(4):398-403.
24. Nahed S, Hanan AM. Effects of renal ischemia reperfusion on brain, liver & kidney tissues in adult male rats. Life Science Journal. 2011;8(1): 204-12.
25. Nasirzadeh MR, Nourazar AR, Khalili-Moghaddam S, Mohammadiani M. Effect of alcoholic extract of Euphorbia cyparissias on the brain antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic male rats. Feyz. 2014;18(3):194-200. (in Persian)
26. Somi MH, Hajipour B, Asl NA, Estakhri R, Azar AN, Zade MN, et al. Pioglitazone attenuates ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats. Transplantation Proceedings. 2009;41(10):4105-9.
27- Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik H, et al. Melatonin protects from Ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. Journal of Pineal Research. 2007;43(2):172-8.
28. Hazman O, Ovali S. Investigation of the anti-inflammatory effects of safranal on high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2diabetes rat model. Inflammation. 2015;38(3):1012-9.
29. Uzar E, Alp H, Cevik MU, Fırat U, Evliyaoglu O, Tufek A, et al. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. Neurological Sciences. 2012;33(3):567-74.
30. Mao X, Xia B, Zheng M, Zhou Z. Assessment of the anti-inflammatory, analgesic and sedative effects of oleuropein from Olea europaea. Cellular and Molecular Biology. 2019;65(1):52.

Effects of Oleuropein on renal antioxidant status and serum inflammatory factors in Streptozotocin-induced diabetic male rat

Received: 1 Dec 2021 Accepted: 29 Jan 2022

Negin Amirashjaei Asalemi[1], Mohammadreza Nasirzadeh[2]*, Jafar Rahmani Kahnamoei[3]
1. Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz medical sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran 2. Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran 3. Assistant Professor, Department of Clinical sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Abstract

Introduction: Intrarenal oxidative stress plays a critical role in the initiation and progression of diabetic kidney disease. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of oleuropein on the activity of antioxidant enzymes of kidney tissue and anti-inflammatory factors in diabetic induced Streptozotocin male rats.

Materials and Methods: In this study, 28 adult male, Wistar rats, with a weight range of 190±30 gr, were randomly divided into 4 equal groups (n=7): control group, diabetic animals, treatment group and oleuropein group. Diabetes were induced in rats by a single injection of 60 mg / kg streptozotocin. Rats in the oleuropein and treatment groups received oleuropein at a daily dose of 60 mg / kg by gastric gavage for 30 days. At the end of the treatment, serum concentration of blood glucose, urea, Creatinine, IL-1, IL-6 and kidney tissue antioxidant including superoxide dismutase (SOD) glutathione peroxidase (GPX) enzymes activity, total antioxidant capacity (TAC) and Malondialdehyde level were measured.

Results: The results revealed that serum level of blood glucose, urea, Creatinine, IL-1and IL-6 increased significantly in diabetic group compared with the control group ($p<0.001$). In addition, TAC, SOD and GPX activity of kidney tissue increased and MDA level of kidney tissue decreased significantly in the treatment group compared with the diabetic group ($p<0.001$).

**Conclusion: ** The present study indicated that oral oleuropein can reduce blood glucose, oxidative stress and IL-1 and IL-6. These effects may be due to its ability in strengthening the antioxidant defense system.

Keywords: Oleuropein, Antioxidant enzymes, Diabetes, Kidney, Rat

***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Email: mr.nasirzadeh@iaut.ac.ir **Tel:** +9891410151081 **Fax:** +984136373935