

تاثیر محافظتی کروسین بر عملکرد کلیه در نفروپاتی ناشی از هیپرگلیسمی مزمن کنترل نشده در موش صحرایی

حبیب یاری بیگی^۱، دکتر محمد تقی محمدی^۲

نویسنده‌ی مسئول: گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
Mohammadi.mohammad@yaho.com دریافت: ۹۴/۱۰/۹ پذیرش: ۹۵/۶/۱

چکیده

زمینه و هدف: طبق مطالعات قبلی، التهاب و استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی در پاتوفیزیولوژی نفروپاتی دیابتی دارند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات محافظتی کروسین به عنوان یک ضدالتهاب و آنتی اکسیدان قوی، بر عملکرد کلیه و استرس اکسیداتیو در مدل تجربی نفروپاتی دیابتی بود.

روش بررسی: در این مطالعه‌ی تجربی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم) به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند ($n=6$ هر گروه): نرمال، نرمال درمان شده، دیابتی، دیابتی درمان شده. موش‌ها با تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم دیابتی شدند. حیوانات درمان شونده کروسین را با دوز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی به مدت هشت هفته دریافت کردند. در پایان مطالعه، نمونه‌های خونی جهت ارزیابی میزان گلوکز و کراتینین سرم جمع‌آوری شدند. همچنین میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و نیترات کلیه نیز سنجیده شد.

یافته‌ها: هیپرگلیسمی مزمن (گلوکز خون بیشتر از ۴۰۰ میلی گرم در صد میلی لیتر) باعث افزایش معنی دار کراتینین حیوانات دیابتی ($4/51 \pm 0/45$ میلی گرم بر دسی لیتر) در مقایسه با گروه نرمال ($0/72 \pm 0/09$ میلی گرم بر دسی لیتر) گردید ($P < 0/0001$). همچنین هیپرگلیسمی منجر به کاهش مقدار نیترات (۳۷ درصد) به همراه افزایش تولید مالون‌دی‌آلدهید ($13 \pm 0/19$ میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) نسبت به گروه نرمال ($10/22 \pm 0/54$ میلی گرم بر دسی لیتر) گردید. کروسین به طور معنی داری سبب کاهش میزان کراتینین سرم ($1/12 \pm 0/13$ میلی گرم بر دسی لیتر)، ($P < 0/0001$)، به همراه گلوکز سرم (۹ درصد) در حیوانات دیابتی شد. در نهایت مقدار مالون‌دی‌آلدهید به طور معنی داری تا ۲۹ درصد در موش‌های دیابتی درمان شده در مقایسه با حیوانات درمان نشده کاهش یافت ($P < 0/0001$).

نتیجه گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، به نظر می‌رسد کروسین از طریق مهار استرس اکسیداتیو و کاهش اکسیداسیون لیپیدها در جلوگیری از نفروپاتی دیابتی نقش دارد.

واژگان کلیدی: دیابت شیرین، کروسین، نفروپاتی دیابتی، استرس اکسیداتیو، هیپرگلیسمی

مقدمه

شیوع بیماری دیابت در جهان به سرعت رو به افزایش است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰ حدود یک سوم جمعیت جهان به دیابت مبتلا شوند (۱). این بیماری مزمن دارای عوارض متابولیک و قلبی عروقی فراوانی است که از

۱- دانشجوی دکترای فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران
۲- دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشیار گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران

و جریان خون کلیه بر عهده داشته و در ایجاد نفروپاتی دیابتی نقش مهمی دارد. طبق یافته‌های مطالعات پیشین میزان تولید نیتریک اکساید در جریان نفروپاتی دیابتی به میزان زیادی کاهش یافته و این کاهش باعث نقص در کنترل جریان خون کلیه شده و در بروز آسیب‌های ساختاری نفرون‌ها که در حین نفروپاتی به وجود می‌آید، نقش مهمی ایفا می‌کند (۷ و ۸).

با توجه به اهمیت رادیکال‌های آزاد در ایجاد نفروپاتی دیابتی استفاده از ترکیباتی که بتوانند این رادیکال‌ها را در حین هیپرگلیسمی مزمن حذف نمایند، در جلوگیری از پیشرفت این بیماری موثر خواهند بود. کروسین از اجزای موثر موجود در گیاه زعفران (*L-Crocus Sativus*) است که تنها کاروتنوید آبدوست موجود در طبیعت به شمار می‌رود. مطالعات قبلی اثرات آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی قوی این ترکیب را به خوبی نشان داده‌اند (۹ و ۱۰). کروسین به دلیل ساختار ویژه‌ی خود می‌تواند به سرعت به رادیکال‌های آزاد اکسیژن متصل شده و آن‌ها را از محیطشان جمع‌آوری نماید (۹). در مطالعات متعدد اثرات آنتی اکسیدانی و ضد استرس اکسیداتیو این ترکیب به اثبات رسیده است (۱۱ و ۱۲). در یک مطالعه مشخص شد که کروسین با اثرات آنتی اکسیدانی از تشکیل پلاک‌های بتا آمیلوئید در مغز جلوگیری کرده و روند پیشرفت بیماری آلزایمر را متوقف می‌نماید (۱۳). در مطالعه‌ای دیگر کروسین از طریق اثرات آنتی اکسیدانی در بافت کلیه از آسیب‌های ایسکمی کلیه جلوگیری کرده و باعث بهبود عملکرد کلیه ایسکمی شده است (۱۴). همچنین در مدل دیگری از ایسکمی، خونرسانی مجدد قلب کروسین به واسطه‌ی اثرات ضد استرس اکسیداتیو از آسیب به بافت قلب جلوگیری کرده است (۱۵). در چند مطالعه‌ی دیگر که بر روی آسیب ناشی از ایسکمی مغز (۱۶) و ایسکمی - خونرسانی عضله‌ی اسکلتی (۱۷) انجام شده، استفاده از کروسین به مقدار زیادی شدت آسیب‌های ایسکمی را به واسطه‌ی اثرات آنتی اکسیدانی کاهش داده است. نهایتاً در یک بررسی مشخص

مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به نفروپاتی اشاره نمود (۲). نفروپاتی دیابتی یکی از اصلی‌ترین دلایل آسیب به کلیه و عامل از دست رفتن دائمی عملکرد کلیه‌ها در بیماران دیابتی محسوب می‌شود (۲). مطالعات زیادی در خصوص پاتوفیزیولوژی این بیماری و آسیب‌هایی که در ساختار و عملکرد کلیه‌ها در حین دیابت به وجود می‌آید انجام گرفته است. این آسیب‌ها شامل از دست رفتن سلول‌های پودوسیت، فیروز توپولی، ضخیم شدن غشای پایه گلومرولی و توپولی، افزایش حجم فضای مزانشیال، آسیب‌های عروقی کلیه و هیپرتروفی گلومرولی می‌باشند (۳). در طی پیشرفت نفروپاتی ناشی از دیابت، عملکرد کلیه به مرور زمان دچار نقص شده و افزایش دفع آلبومین در ادرار که شاخص اصلی نفروپاتی دیابتی است ظاهر می‌شود و در طی مراحل نهایی بیماری کاهش فیلتراسیون گلومرولی، دفع گلبول قرمز در ادرار، افزایش غلظت کراتینین پلاسما و ادم محیطی مشاهده می‌گردد (۳).

مطالعات اخیر مسیرهای مخرب سلولی فراوانی در ارتباط با فرآیند ایجاد نفروپاتی دیابتی را نشان داده‌اند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در بافت کلیه و بروز استرس اکسیداتیو اشاره نمود (۴). در شرایط هیپرگلیسمی مزمن و کنترل نشده، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) به صورت گسترده‌ای در بافت کلیه افزایش می‌یابد که این رادیکال‌ها با اتصال به ماکرومولکول‌های مهم و کلیدی سلول از جمله اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها باعث اختلال در عملکرد سلول‌ها می‌گردند (۵ و ۴). در مواردی این رادیکال‌ها باعث فعال شدن مسیرهای آپوپتوز و نکروز سلولی در بافت کلیه شده و سبب مرگ سلول‌ها می‌گردند (۵ و ۴). همچنین اتصال این رادیکال‌ها به اسیدهای چرب غیر اشباع غشای سلولی سبب پراکسیداسیون آن‌ها و تولید مالون‌دی‌آلدید (MDA) می‌شود (۶). از طرفی نیتریک اکساید (NO) به عنوان یک ماده‌ی موثر بر عروق و با نیمه عمر بسیار کوتاه نقش بسیار مهمی در تنظیم تونوسیت‌ی عروق

گردید کروسین میزان استرس اکسیداتیو که در جریان برخی آسیب‌های مزمن کلیوی به وجود می‌آید را به مقدار قابل ملاحظه ای کاهش می‌دهد (۱۸).

هیپرگلیسمی مزمن و کنترل نشده آغازگر و فعال کننده ی سیگنال‌هایی است که با ایجاد آسیب‌های شدید ساختاری منجر به نقص در عملکرد کلیه شده و نهایتاً باعث بروز نفروپاتی و صدمات غیر قابل برگشت در عملکرد کلیه می‌شود (۴ و ۳). طبق یافته‌های اخیر آسیب به سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بافت کلیه و تولید انواع رادیکال‌های آزاد نقش کلیدی در بروز نفروپاتی ناشی از هیپرگلیسمی (گلوکز خون بالا) مزمن دارد (۶). از آن جایی که بر پایه ی نتایج تحقیقات ارائه شده کروسین دارای ماهیت آنتی اکسیدانی بسیار خوبی در شرایط مختلف پاتولوژیک است و از طرفی تولید انواع رادیکال‌های آزاد و تضعیف دفاع آنتی اکسیدانی بافت کلیه نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی نفروپاتی و آسیب به عملکرد کلیه در شرایط هیپرگلیسمی مزمن و کنترل نشده بر عهده دارد (۱۸ و ۱۹). مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی تاثیر محافظتی کروسین بر عملکرد کلیه، میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز استرس اکسیداتیو و همچنین میزان تولید نیتریک اکساید کلیه در مدل تجربی نفروپاتی انجام شد.

روش بررسی

حیوانات و نحوه‌ی نگهداری: در این مطالعه‌ی مداخله‌ای-تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار تهیه شده از مرکز پژوهشی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله در محدوده‌ی وزنی ۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد. در تمامی آزمایش‌ها شرایط کار با حیوانات آزمایشگاهی تعیین شده توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله رعایت گردید. حیوانات بدون داشتن محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا در شرایط استاندارد (۱۲) ساعت روشنایی و تاریکی با درجه حرارت 22 ± 2

درجه‌ی سانتی‌گراد) در طی آزمایش نگهداری شدند. **نحوه القای دیابت قندی:** برای ایجاد دیابت قندی نوع اول از استرپتوزوتوسین (سیگما، USA) استفاده شد. حیوانات توسط داروی ترکیبی کنامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و دیازپام (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس از محلول از پیش تهیه شده‌ی استرپتوزوتوسین (به میزان ۴۰ میلی گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن) از راه ورید جانبی دم به حیوان تزریق گردید. سه روز بعد از تزریق، حیوانات با علائم پرنوشی و پرادراری مشخص شدند. ۷۲ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، میزان قند خون اندازه‌گیری و حیواناتی که گلوکز سرمی بالای داشتند (بالای ۴۰۰ میلی گرم در دسی‌لیتر)، به‌عنوان حیوان دیابتی انتخاب و وارد دوره‌ی آزمایش گردیدند (۲۰).

گروه بندی حیوانات: در این مطالعه موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند ($N=24$): گروه نرمال، گروه نرمال و کروسین، گروه دیابتی، گروه دیابتی و کروسین. گروه نرمال شامل موش‌های صحرایی سالم بود که در طول آزمایش هیچ دارویی مصرف نکرده و تنها نیم میلی‌لیتر نرمال سالین به صورت داخل صفاقی و روزانه به مدت ۲ ماه دریافت کردند. در گروه نرمال و کروسین تمامی پروتکل‌های آزمایش شبیه گروه نرمال بود با این تفاوت که به مدت ۲ ماه داروی کروسین را به مقدار ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم به‌صورت روزانه از طریق داخل صفاقی دریافت کردند. دیابت نوع اول در حیوانات گروه دیابتی با تزریق درون وریدی استرپتوزوتوسین القا گردید. پس از ۳ روز از ثابت شدن علائم دیابت (پرنوشی، پرادراری و گلوکز بالای سرم) از حیوانات این گروه به‌عنوان کنترل دیابتی استفاده شد. حیوانات این گروه در طول آزمایش، هیچ دارویی مصرف نکرده و تنها نیم میلی‌لیتر نرمال سالین به‌طور روزانه به‌مدت ۲ ماه از طریق داخل صفاقی دریافت کردند. در حیوانات گروه دیابتی و کروسین (سیگما، آلمان) تمامی انجام مراحل آزمایش

آلکالین پیکرات تشکیل کمپلکس رنگی داده که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار کراتینین در نمونه است. جهت اندازه‌گیری، محلول هیدروکسید سدیم و اسید پیکریک به ترتیب به نسبت ۴ به ۱ با هم مخلوط شدند. سپس با استفاده از سمپلر به مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد، به ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول آماده شده اضافه شده و ۶۰ ثانیه بعد از مخلوط کردن نمونه‌ها یا استاندارد با محلول مورد نظر جذب نوری اولیه و دو دقیقه بعد، جذب نوری ثانویه در طول موج ۵۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. در نهایت غلظت کراتینین خون بر حسب میلی گرم در صد میلی لیتر (میلی گرم بر دسی لیتر) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

کراتینین سرم (میلی گرم بر دسی لیتر) = [اختلاف جذب نوری نمونه ÷ جذب نوری استاندارد] × غلظت محلول استاندارد (میلی گرم بر دسی لیتر)

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص اکسیداسیون لیپیدها: برای تعیین میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، از روش Satho استفاده شد (۲۱). در روز آزمایش، بافت کلیه منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ با بفر فسفات سالین هموژنیزه شده و پس از آن نمونه‌ها در ۱۴۰۰۰ g و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در ادامه، به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه، ۱/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی لیتر اسیدتیوباربیتوریک ۰/۶۷ درصد به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار گرفت؛ سپس ۲ میلی لیتر ۱- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. غلظت MDA، با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ ترا اتوکسی پروپان

شبه گروه دیابتی بود، با این تفاوت که در طی دوره‌ی آزمایش با داروی کروسین (به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت روزانه از طریق داخل صفاقی تیمار شدند.

در انتهای آزمایش، حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و پس از خونگیری، بافت کلیه‌ی حیوان جدا و به سرعت به داخل نیتروژن مایع و سپس به فریزر -۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال یافت. سرم خون به وسیله دستگاه سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) جدا گردید. از سرم‌های جدا شده پارامترهای بیوشیمیایی کراتینین و گلوکز سرم به وسیله پروتکل کیت‌های شرکت پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت.

اندازه‌گیری غلظت سرمی گلوکز: جهت اندازه‌گیری گلوکز خون از کیت تشخیص کمی گلوکز سرم به روش نور سنجی (پارس آزمون، ایران) استفاده شد. در این روش آب اکسیژنه آزاد شده از گلوکز در مجاورت آنزیم گلوکز اکسیداز با فنول و ۴-امینو آنتی پیرین در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل شده که با روش نورسنجی قابل اندازه‌گیری بوده با مقدار گلوکز رابطه‌ی مستقیم دارد. بدین منظور با استفاده از سمپلر ۱۰ میکرولیتر از نمونه (سرم تهیه شده) یا محلول استاندارد را با ۱۰۰۰ میکرولیتر از معرف کیت تشخیص گلوکز مخلوط نموده و پس از ۲۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد جذب نوری در طول موج ۵۴۶ نانومتر به واسطه‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL-2501, England) قرائت شد و غلظت گلوکز سرم (میلی گرم در صد میلی لیتر) از فرمول زیر محاسبه گردید:

گلوکز سرم (میلی گرم بر دسی لیتر) = [جذب نوری نمونه ÷ جذب نوری استاندارد] × غلظت محلول استاندارد (میلی گرم بر دسی لیتر)

اندازه‌گیری غلظت سرمی کراتینین: جهت اندازه‌گیری کراتینین خون از کیت تشخیص کمی کراتینین سرم با روش نورسنجی (پارس آزمون، ایران) استفاده شد. در این آزمایش کراتینین با

به عنوان استاندارد، بر حسب میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد. محلول استاندارد MDA در غلظت های ۲۰۰-۰/۲ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰ درصد تهیه گردید. سپس مقدار MDA به دست آمده بر مقدار پروتئین به دست آمده (میلی گرم در یک میلی لیتر) تقسیم شده و در نهایت مقدار MDA بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. **اندازه گیری میزان نیترات کلیه:** اندازه گیری میزان نیترات نیز با استفاده از متد گریس انجام شد (۲۲). در روز آزمایش، بافت کلیه منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنیزه شده و پس از آن نمونه ها در ۱۴۰۰۰ g و ۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. از محلول رویی جهت سنجش نیترات استفاده شد. سپس با استفاده از سولفات روی، پروتئین زدایی نمونه ها انجام شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید وانادیوم III (۸ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه شده تا نیتريت را به نیترات احیا کند. سپس محلول گریس شامل ۵۰ میکرو لیتر سولفانیل آمید (۲ درصد) و ۵۰ میکرولیتر اتیلین دی آمید دی هیدروکلرید (۱ درصد) اضافه گردیده و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شد. سپس رنگ به دست آمده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شده و جذب نمونه ها با جذب استاندارد (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرو مولار نیترات) مقایسه و غلظت نمونه ها محاسبه گردید. در نهایت غلظت نیترات بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین بیان شد.

اندازه گیری میزان پروتئین کلیه: برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۳). حجم معینی از عصاره بافتی با رقت مناسب را برداشته و به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شد. سپس ۲ میلی لیتر از محلول برادفورد با رقت ۱:۳ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر، میزان جذب قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد، ابتدا محلول ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از آلبومین سرم گاوی

(BSA) تهیه گردید. سپس غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی لیتر از آن ساخته و به عنوان غلظت های استاندارد به کار برده شد.

بررسی آسیب-شناختی کلیه: جهت مطالعه ی میکروسکوپی، ابتدا نمونه ی مورد نظر (بافت کلیه) به مدت ۲ هفته جهت تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت، سپس بقیه ی مراحل به شرح زیر انجام شد. در ادامه، مراحل پاساژ بافت و قالب گیری با پارافین، طبق روش های روتین آماده سازی بافت صورت گرفت. مرحله ی برش گیری به وسیله ی دستگاه میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر انجام شد. سپس مقاطع تهیه شده در محل مورد نظر بر روی لام منتقل و برش ها با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اوژین (H&E) رنگ آمیزی شدند. در نهایت، بر روی برش های تهیه شده آب گیری و شفاف سازی و فرآیند مانت کردن انجام شد. در پایان، لام های تهیه شده با دقت و با دستگاه میکروسکوپ نوری (Nikon) مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از دوربین مخصوص میکروسکوپ متصل به کامپیوتر از نقاط مورد نظر تصویر تهیه گردید و شاخص های نکروز و آسیب گломروولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری: نتایج آماری به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) ارائه شده است. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ی ۲۱ و آزمون آماری آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) تجزیه و تحلیل شدند. ضمناً، برای مقایسه ی داده های شروع و خاتمه آزمایش از روش آماری Paired T-test استفاده گردید. سطح معنی داری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج گلوکز سرم: غلظت گلوکز سرمی حیوانات مورد مطالعه در تمامی گروه ها در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان گلوکز سرمی حیوانات گروه نرمال در شروع و خاتمه

آزمایش (۰/۹۷±۰/۱۶ میلی گرم در صد میلی لیتر) و خاتمه (۰/۴۵±۰/۵۱ میلی گرم در صد میلی لیتر) در مقایسه با گروه نرمال به طور معنی داری افزایش داد ($P<0/001$ و $P<0/05$). همچنین القای دیابت میزان کراتینین سرم را در حیوانات گروه دیابتی و کروسین (۰/۹۹±۰/۱۷ میلی گرم در صد میلی لیتر) در مقایسه با گروه نرمال به طور معنی داری افزایش داد ($P<0/05$). در حالی که کروسین توانست از افزایش میزان سرمی کراتینین در حیوانات گروه دیابتی درمان شده (۱/۱۲±۰/۱۳ میلی گرم در صد میلی لیتر) جلوگیری نماید که میزان آن در مقایسه با گروه دیابتی از لحاظ آماری معنی داری بود ($P<0/001$).

نتایج مالون دی آلدئید: تغییرات غلظت مالون دی آلدئید (MDA) بافت کلیه بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین در جدول ۲ نشان داده شده است. القای دیابت در طی ۶۰ روز، میزان غلظت MDA بافت کلیه را در حیوانات گروه کنترل دیابتی (۱۳/۰۰±۰/۱۹ میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با گروه نرمال (۱۰/۲۲±۰/۵۴ میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) به طور معنی داری افزایش داد ($P<0/001$). تیمار با کروسین در طی ۶۰ روز، میزان MDA بافت کلیه گروه دیابتی درمان شده (۹/۲۲±۰/۷۹ میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با گروه دیابتی را به طور معنی داری کاهش داد ($P<0/001$). در حالی که تیمار با کروسین به مدت ۶۰ روز، هیچ تاثیر معنی داری در میزان غلظت MDA بافت کلیه در گروه نرمال درمان شده (۹/۴۳±۰/۵۸ میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با گروه کنترل نرمال ایجاد نکرد.

نتایج نیترات: تغییرات غلظت نیترات (شاخص تولید نیتریک اکساید) بافت کلیه بر حسب میکروگرم بر میلی گرم پروتئین در جدول ۲ نشان داده شده است. القای دیابت در طی ۶۰ روز، میزان غلظت نیترات بافت کلیه را در حیوانات گروه کنترل دیابتی (۲۰±۳ میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با گروه نرمال (۳۲±۸ میکروگرم بر میلی گرم پروتئین)

آزمایش به ترتیب برابر با ۱۰۶±۹ و ۱۰۰±۱۵ میلی گرم در صد میلی لیتر بود که در مقایسه آماری بین آنها تغییر معنی داری وجود نداشت. میزان گلوکز سرم در حیوانات تیمار شده با کروسین (گروه نرمال و کروسین) در شروع آزمایش ۱۱۸±۷ میلی گرم در صد میلی لیتر و خاتمه ۸۶±۱۷ میلی گرم در صد میلی لیتر بود. مقدار گلوکز سرم در حیوانات این گروه در پایان آزمایش کمتر از زمان شروع بود اما از لحاظ آماری بین آنها تغییر معنی داری وجود نداشت. القای دیابت میزان گلوکز سرم را در حیوانات گروه دیابتی (۴۵۰±۳۵ میلی گرم در صد میلی لیتر) در مقایسه با گروه نرمال به طور معنی داری افزایش داد ($P<0/001$) که میزان آن در پایان آزمایش برابر ۴۲۱±۳۳ میلی گرم در صد میلی لیتر بود. همچنین القای دیابت، میزان گلوکز سرم را در حیوانات گروه دیابتی و کروسین (۴۱۵±۲۵ میلی گرم در صد میلی لیتر) در مقایسه با گروه نرمال به طور معنی داری افزایش داد ($P<0/001$) ولی با گروه دیابتی از لحاظ مقایسه آماری تفاوت معنی داری وجود نداشت. کروسین توانست میزان گلوکز سرم را در حیوانات گروه دیابتی درمان شده (۳۷۷±۳۰ میلی گرم در صد میلی لیتر) در مقایسه با گروه دیابتی به طور معنی داری کاهش دهد ($P<0/05$).

نتایج کراتینین سرم: مقادیر سرمی کراتینین حیوانات مورد مطالعه در تمامی گروه ها در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان کراتینین سرمی حیوانات گروه نرمال در شروع و خاتمه آزمایش به ترتیب برابر با ۰/۶۴±۰/۱۷ و ۰/۷۲±۰/۰۹ میلی گرم در صد میلی لیتر بود که در مقایسه آماری بین آنها تغییر معنی داری وجود نداشت. میزان کراتینین سرم در حیوانات تیمار شده با کروسین (گروه نرمال و کروسین) در شروع آزمایش ۰/۸۲±۰/۲۳ میلی گرم در صد میلی لیتر و خاتمه ۰/۵۸±۰/۰۸ میلی گرم در صد میلی لیتر بود که بین آنها از لحاظ آماری تغییر معنی داری وجود نداشت. القای دیابت میزان کراتینین سرم را در حیوانات گروه دیابتی در شروع

به طور معنی داری کاهش داد ($P < 0.05$). تیمار با کروسین در طی ۶۰ روز، بر میزان نیترات بافت کلیه گروه دیابتی درمان شده (22 ± 4) میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با گروه دیابتی تاثیر معنی داری نداشت. همچنین تیمار با کروسین به مدت ۶۰ روز، هیچ تاثیر معنی داری در میزان نیترات بافت کلیه در گروه نرمال درمان شده (37 ± 7) میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) در مقایسه با گروه کنترل نرمال ایجاد نکرد.

جدول ۱؛ مقادیر گلوکز و کراتینین سرم (میلی گرم بر دسی لیتر) حیوانات مورد مطالعه در شروع و خاتمه آزمایش

گروه ها	گلوکز سرم (mg/dL)		کراتینین سرم (mg/dL)	
	شروع	پایان	شروع	پایان
نرمال	106 ± 9	100 ± 15	0.64 ± 0.17	0.72 ± 0.09
نرمال و کروسین	118 ± 7	86 ± 17	0.82 ± 0.23	0.58 ± 0.08
دیابتی	$450 \pm 35^{***}$	$421 \pm 33^{***}$	$0.97 \pm 0.16^*$	$4/51 \pm 0.45^{***}$
دیابتی و کروسین	$415 \pm 25^{***}$	$377 \pm 30^{***\#}$	$0.99 \pm 0.17^*$	$1/12 \pm 0.13^{***\#\#}$

داده ها به صورت $Means \pm SD$ نمایش داده شده است.

* ($P < 0.05$) و *** ($P < 0.001$) نشان دهنده تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه نرمال و داده های شروع آزمایش

($P < 0.05$) و ### ($P < 0.001$) نشان دهنده تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه دیابتی

جدول ۲؛ مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) و نیترات بافت کلیه (میکروگرم بر میلی گرم پروتئین) در حیوانات مورد مطالعه در پایان آزمایش

گروه ها	مالون دی آلدئید (MDA) ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$)		نیترات ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$)	
نرمال	$10/22 \pm 0.54$		32 ± 8	
نرمال و کروسین	$9/43 \pm 0.58^*$		37 ± 7	
دیابتی	$13/00 \pm 0.19^{***}$		$20 \pm 3^*$	
دیابتی و کروسین	$9/22 \pm 0.79^{***\#}$		$22 \pm 4^*$	

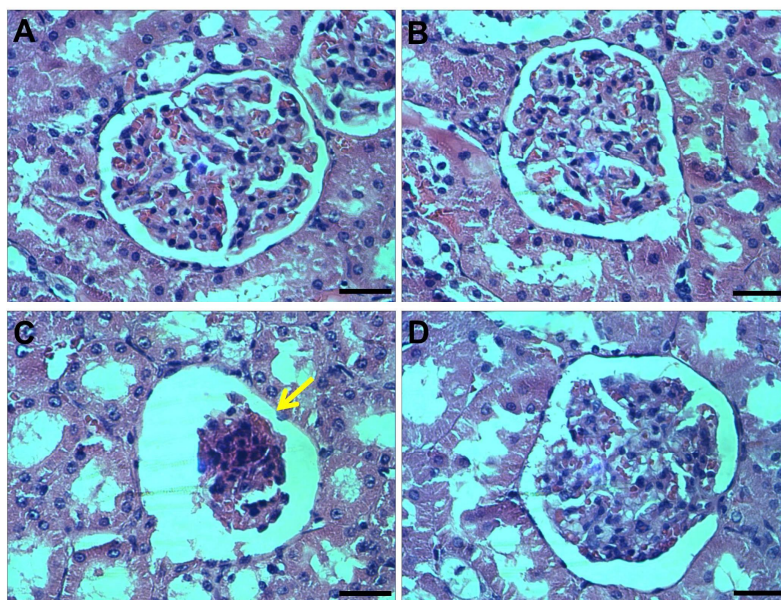
داده ها به صورت $Mean \pm SD$ نمایش داده شده است.

* ($P < 0.05$) و *** ($P < 0.001$) نشان دهنده تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه نرمال

($P < 0.001$) نشان دهنده تفاوت معنی دار در مقایسه با گروه دیابتی

گلومرولواسکلروز، کاهش تعداد گلومرول‌ها و افزایش گلومرول‌های تحلیل‌رفته در مقایسه با گروه‌های نرمال به‌وضوح در بافت کلیه مشاهده گردید. در صورتی‌که در حیوانات دیابتی درمان‌شده با کروسین، فضای گلومرولی، مویرگ‌ها و سلول‌های سازنده گلومرول‌ها و توبول‌ها همانند حیوانات گروه نرمال، سالم به‌نظر می‌رسند.

نتایج بررسی‌های آسیب‌شناختی: همان‌طور که تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از بافت کلیه (شکل ۱) حیوانات مورد آزمایش نشان می‌دهد در حیوانات گروه نرمال و نرمال درمان‌شده با کروسین گلومرول، فضای کپسول بومن و شکل توبول‌ها در حالت طبیعی و سالم مشاهده می‌شوند. در حیوانات گروه دیابتی، اتساع فضای کپسول بومن،



شکل ۱: مقاطع عرضی بافت کلیه با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین در گروه‌های مختلف. در تصاویر به دست آمده از حیوانات گروه‌های نرمال (A) و نرمال تیمار شده با کروسین (B) گلومرول‌ها طبیعی هستند. در گروه دیابتی گلومرول‌ها آسیب دیده و گلومرولواسکلروز و آسیب توبولی به وضوح مشاهده می‌شود (C) که میزان این آسیب در گروه دیابتی درمان شده با کروسین کاهش یافته است (D). (400X, Scale bars= 30 μ m)

بحث

توانست میزان کراتینین خون این حیوانات را به‌همراه تغییرات آسیب‌شناختی کاهش دهد. به علاوه در حیوانات دیابتی درمان‌شده، میزان گلوکز سرم و فرآیند استرس اکسیداتیو (کاهش غلظت MDA) در بافت کلیه کاهش یافت.

در مطالعه‌ی حاضر کروسین میزان گلوکز سرمی حیوانات دیابتی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. همین‌طور این کاهش در حیوانات گروه نرمال درمان شده توسط کروسین هم مشاهده شد ولی از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. اثرات

در مطالعه‌ی حاضر هیپرگلیسمی توانست علائم نفروپاتی در حیوانات مورد آزمایش را به‌خوبی ایجاد کند چرا که میزان کراتینین خون به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و آسیب‌های بافتی نیز در بافت کلیه این حیوانات مشهود بود. در این میان، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (افزایش میزان MDA) در بافت کلیه افزایش و مقدار نیترات بافت کلیه (شاخص تولید نیتریک اکساید) کاهش یافت. از طرفی درمان با کروسین

کاهندگی گلوکز خون توسط کروسین، که از مهم‌ترین کاروتنوئیدهای گیاه زعفران بوده، در موارد متعدد گزارش شده است. در یک مطالعه استفاده از کروسین به مدت ۶ هفته باعث کاهش میزان هموگلوبین A1c و همچنین گلوکز ناشتای خون در حیوانات دیابتی گردید (۲۴). همچنین در مطالعه‌ی دیگری تیمار با کروسین به مدت ۵ ماه موجب کاهش قند خون ناشتا در حیوانات دیابتی شد (۲۵). پیشنهاد شده این اثرات کاهندگی قند خون کروسین به دلیل تاثیرات مثبت آن بر عملکرد سلول‌های بتای پانکراس و افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس باشد (۲۶). همچنین مشخص شده کروسین علاوه بر بهبود عملکرد سلول‌های بتای پانکراس با تاثیر بر رستپورهای محیطی انسولین سبب کاهش مقاومت به انسولین می‌گردد (۲۶ و ۲۵).

در طی پیشرفت نفروپاتی دیابتی، تغییرات آسیب‌شناختی گسترده‌ای در بافت کلیه رخ داده و علائم متعددی از نقص عملکرد کلیه ظاهر می‌شود که افزایش میزان کراتینین خون از مهم‌ترین آن‌ها است (۸). در مطالعه‌ی حاضر نیز در طی دو ماه هیپرگلیسمی مزمن و کنترل نشده، افزایش معنی‌داری در غلظت کراتینین خون به همراه تغییرات آسیب‌شناختی بافت کلیه مشاهده شد. دلایل مختلفی می‌تواند باعث افزایش کراتینین خون شود که از جمله می‌توان به اختلال در عملکرد کلیه به دلیل تخریب تعداد زیادی از گلوMERول‌های کلیه و گلوMERولواسکلروز اشاره کرد (۲۷). نتیجه‌ی بررسی‌های آسیب‌شناختی ما نیز به‌خوبی این تغییرات را نشان می‌دهد. همچنین آسیب به مویرگ‌های گلوMERولی و مسدود شدن آن‌ها که در طی هیپرگلیسمی مزمن اتفاق می‌افتد باعث اختلال در گردش خون عروق ریز کلیه شده و در نهایت، منجر به کاهش میزان فیلتراسیون گلوMERولی خواهد شد (۲۷). از آن جایی‌که کراتینین یک فاکتور وابسته به فیلتراسیون گلوMERولی است به‌نظر می‌رسد کاهش فیلتراسیون گلوMERولی، دفع کراتینین را تحت تاثیر قرار داده و منجر به افزایش کراتینین خون در

مطالعه‌ی حاضر شده است. از طرفی نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد تیمار با کروسین توانسته میزان کراتینین پلاسما را در طی هیپرگلیسمی مزمن کاهش دهد. این نتایج، نشانگر این مطلب است که احتمالاً کروسین، از آسیب به سد فیلتراسیون و کاهش فیلتراسیون در طی هیپرگلیسمی جلوگیری می‌کند چرا که درمان با کروسین، گلوکز خون را به حد نرمال رسانیده است. در راستای این یافته‌ها، می‌توان به نتایج بررسی‌های آسیب‌شناختی مبنی بر اینکه درمان با کروسین در حیوانات دیابتی شده می‌تواند از آسیب به گلوMERول‌ها و بافت کلیه جلوگیری کند، اشاره نمود.

طبق یافته‌های محققین افزایش تولید انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن از عوامل اصلی آسیب‌های ساختاری در گلوMERول‌ها بوده و از طریق صدمه به پروتئین‌های سلولی و غشای پایه سبب آسیب به سد فیلتراسیون می‌شود (۴ و ۳). طبق یافته‌های مطالعه‌ی حاضر میزان MDA و اکسیداسیون لیپیدها (شاخص تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن) در بافت کلیه در زمان دیابت به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. بر اساس یافته‌های هوانگ و همکاران آنزیم کاتالاز یکی از آنزیم‌های مهم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن بوده که در شرایط هیپرگلیسمی کاهش قابل توجهی پیدا می‌کند (۲۸). همچنین نتایج مطالعات حاکی از آن است که میزان گلوTاتیون به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان قوی و نیز فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط هیپرگلیسمی کاهش می‌یابد (۲۹ و ۴). از آن جایی‌که این آنزیم‌ها سبب تجزیه و حذف رادیکال‌های آزاد می‌شوند، کاهش فعالیت این آنزیم‌ها مانع از حذف این رادیکال‌های سمی در بافت کلیه شده و منجر به استرس اکسیداتیو در بافت کلیه می‌شود. نهایتاً، گزارش شده بیان آنزیم NADPH-اکسیداز در بافت‌های بدن در شرایط هیپرگلیسمی زیاد شده و باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود (۳۰). نتایج پژوهش حاضر نشان داد استفاده از کروسین میزان رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو در بافت

گسترش نفروپاتی دیابتی را آهسته‌تر کرده و آسیب‌های ساختاری و عملکردی کلیه مانند ضخیم شدن غشای پایه و گسترش فضای مزانشیال را کاهش می‌دهد (۷). در تحقیق حاضر کروسین نتوانست باعث افزایش میزان تولید نیتریک اکساید در حیوانات دیابتی گردد اما آسیب‌های ناشی از دیابت را کاهش داده و باعث بهبود عملکرد کلیه گردید. بنابراین، احتمال دارد اثرات بهبودی بخش کروسین بر عملکرد کلیه مستقل از افزایش سنتز نیتریک اکساید در کلیه باشد.

نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد کروسین از آسیب به ساختار و عملکرد کلیه در طی هیپرگلیسمی مزمن و کنترل نشده جلوگیری می‌کند. همچنین طبق نتایج ما کروسین می‌تواند از طریق اثرات آنتی اکسیدانی، کاهش رادیکال‌های آزاد و مهار فرآیند استرس اکسیداتیو در بافت کلیه از بروز نفروپاتی دیابتی در طی هیپرگلیسمی مزمن جلوگیری نماید.

تقدیر و تشکر

این مقاله قسمتی از نتایج پایان نامه دکترای تخصصی می‌باشد. بدین وسیله از گروه فیزیولوژی و بیوفیزیکی دانشکده‌ی پزشکی و معاونت پژوهش دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله که مقدمات و هزینه مورد نیاز این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

کلیه را کاهش داده است (کاهش مالون‌دی‌آلدهید). گزارش شده کروسین هم به‌صورت مستقیم از طریق اتصال به رادیکال‌های آزاد و هم به‌صورت غیر مستقیم از طریق فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر به کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد (۹). به عنوان مثال آقای فام و همکاران در یک مطالعه نشان دادند کروسین مستقیماً به آنیون سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$) متصل شده و از اثرات مخرب آن جلوگیری می‌کند (۳۱). همچنین در مطالعه‌ی اوچای و همکاران مشخص شده کروسین منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند سوپراکساید دیسموتاز می‌شود (۳۲). نهایتاً، اصدق و همکاران در مطالعه‌ی خود گزارش کردند کروسین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی همچون سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز را به همراه گلوکوتاتیون افزایش داده است (۳۳).

براساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، میزان نیترات کلیه که شاخصی از میزان تولید نیتریک اکساید در بافت کلیه است در طی هیپرگلیسمی کاهش پیدا کرد. گزارش شده میزان پاسخ اتساعی عروق از طریق نیتریک اکساید در افراد دارای دیابت کنترل نشده کاهش می‌یابد (۳۴). از طرفی مهار عملکرد آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی موجب کاهش تولید نیتریک اکساید بافت کلیه در حین دیابت شده و منجر به بروز آسیب‌های عروقی و عملکردی کلیه می‌گردد (۳۵). به‌طوری که افزایش فعالیت این آنزیم باعث کاهش میزان آسیب‌های کلیوی در حین دیابت می‌گردد (۸). نهایتاً، مطالعه‌ی چنگ و همکاران نشان داد بهبود میزان تولید نیتریک اکساید روند

References

- Boyle JP, Thompson TJ, Gregg EW, Barker LE, Williamson DF. Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence.

- Popul Health Metr. 2010; 8: 29.
- Rivero A, Mora C, Muros M, Garcia J, Herrera H, Navarro-Gonzalez J. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. Clin Sci. 2009; 116: 479-92.

- 3- Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. *Vascul Pharmacol*. 2013; 58: 259-71.
- 4- Kashihara N, Haruna Y, Kondeti V, Kanwar Y. Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem*. 2010;17: 4256-69.
- 5- Vadivelan R, Umasankar P, Mandal D, Shanish A, Dhanabal S, Elango K. Oxidative stress induced diabetic nephropathy. *Res J Pharmacol Pharmacodynam*. 2010; 2: 321-3.
- 6- Bhatia S, Shukla R, Madhu SV, Gambhir JK, Prabhu KM. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem*. 2003; 36: 557-62.
- 7- Cheng H, Wang H, Fan X, Pauksakon P, Harris RC. Improvement of endothelial nitric oxide synthase activity retards the progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Kidney Int*. 2012; 82: 1176-83.
- 8- You H, Gao T, Cooper TK, Morris SM, Awad AS. Arginase inhibition mediates renal tissue protection in diabetic nephropathy by a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism. *Kidney Int*. 2013; 84: 1189-97.
- 9- Hosseinzadeh H, Shamsaie F, Mehri S. Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. stigma and its bioactive constituents, crocin and safranal. *Pharmacog Mag*. 2009; 15: 419.
- 10- Ordoudi SA, Tsimidou MZ. Measuring antioxidant and prooxidant capacity using the crocin bleaching assay (CBA). *Methods Mol Biol*. 2015; 1208: 329-44.
- 11- Ghadrdoost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, et al. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011; 667: 222-9.
- 12- Altinoz E, Oner Z, Elbe H, Turkoz Y, Cigremis Y. Protective effect of saffron (its active constituent, crocin) on oxidative stress and hepatic injury in streptozotocin induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol*. 2014; 16: 160-71.
- 13- Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, et al. Inhibitory activity on amyloid- β aggregation and antioxidant properties of *Crocus sativus* stigmas extract and its crocin constituents. *J Agric Food Chem*. 2006; 54: 8762-8.
- 14- Naghizadeh B, Boroushaki MT, Vahdati Mashhadian N, Mansouri SMT. Protective effects of crocin against cisplatin-induced acute renal failure and oxidative stress in rats. *Iran Biomed J*. 2008; 12: 93-100.
- 15- Jahanbakhsh Z, Rasouljan B, Jafari M, et al. Protective effect of crocin against reperfusion-induced cardiac arrhythmias in anesthetized rats. *EXCLI*. 2012; 11: 20-29.
- 16- Zheng Y-Q, Liu J-X, Wang J-N, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res*. 2007; 1138: 86-94.

- 17- Hosseinzadeh H, Modagheh MH, Saffari Z. *Crocus sativus* L.(Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2009; 6: 343-50.
- 18- Karamouzis I, Sarafidis PA, Karamouzis M, et al. Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2008; 28: 397-404.
- 19- Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int*. 2002; 61: 186-94.
- 20- Riahi S, Mohammadi MT, Sobhani V, Ababzadeh S. Chronic aerobic exercise decreases lectin-like low density lipoprotein (LOX-1) receptor expression in heart of diabetic rat. *Iran Biomed J*. 2016; 20: 26-32.
- 21- Kei S. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*. 1978; 90: 37-43.
- 22- Riahi S, Mohammadi MT, Sobhani V, Soleimany M. Chronic effects of aerobic exercise on gene expression of LOX-1 receptor in the heart of rats fed with high fat diet. *Iran J Basic Med Sci*. 2015; 18: 805-12.
- 23- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- 24- Kianbakht S, Hajiaghaee R. Anti-hyperglycemic effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, in alloxan-induced diabetic rats. *J Med Plants*. 2011; 3: 82-9.
- 25- Shirali S, Zahra Bathaie S, Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res*. 2013; 27: 1042-7.
- 26- Mohajeri D, Mousavi G, Doustar Y. Antihyperglycemic and pancreas-protective effects of *Crocus sativus* L.(Saffron) stigma ethanolic extract on rats with alloxan-induced diabetes. *J Biol Sci*. 2009; 9: 302-10.
- 27- Pavkov ME, Knowler WC, Hanson RL, et al. Comparison of serum cystatin C, serum creatinine, measured GFR, and estimated GFR to assess the risk of kidney failure in American Indians with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*. 2013; 62: 33-41.
- 28- Hwang I, Lee J, Huh JY, et al. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes*. 2012; 61: 728-38.
- 29- Call JA, Chain KH, Martin KS, et al. Enhanced skeletal muscle expression of extracellular superoxide dismutase mitigates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy by reducing oxidative stress and aberrant cell signaling. *Circ Heart Fail*. 2015; 8: 188-97.
- 30- Rosa AP, Jacques CE, de Souza LO, et al. Neonatal hyperglycemia induces oxidative stress in the rat brain: the role of pentose phosphate pathway enzymes and NADPH

- oxidase. *Mol Cell Biochem.* 2015; 403: 159-67.
- 31- Pham TQ, Cormier F, Farnworth E, Tong VH, Van Calsteren M-R. Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides Ellis* and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen. *J Agric Food Chem.* 2000; 48: 1455-61.
- 32- Ochiai T, Ohno S, Soeda S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of rat pheochromyctoma (PC-12) cells by its antioxidant effects stronger than those of α -tocopherol. *Neurosci Lett.* 2004; 362: 61-4.
- 33- Asdaq SMB, Inamdar MN. Potential of *Crocus sativus* (saffron) and its constituent, crocin, as hypolipidemic and antioxidant in rats. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010; 162: 358-72.
- 34- Williams SB, Cusco JA, Roddy M-A, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 27: 567-74.
- 35- Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes.* 2007; 56: 666-74.

Protective Effect of Crocin on Kidney Performance in Chronic Uncontrolled Hyperglycemia-Induced Nephropathy in Rat

Yaribeygi H¹, Mohammadi MT¹

¹Dept. of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Mohammadi MT, Dept. of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine,

Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: Mohammadi.mohammadmt@yahoo.com

Received: 30 Dec 2015 **Accepted:** 22 Aug 2016

Background and Objective: Based on previous studies, inflammation and oxidative stress play a crucial role in the pathophysiology of diabetic nephropathy. Therefore, we aimed to examine the protective effects of crocin, as a potent anti-inflammatory and antioxidant, on kidney function and oxidative stress in an experimental model of diabetic nephropathy in male wistar rats.

Materials and Methods: In this experimental study, male wistar rats (190-220 g) were randomly divided into four groups (each n=6); normal, normal treatment, diabetic, diabetic treatment. The rats were made diabetic by an intravenous injection of streptozotocin (40 mg/kg). Treated rats received crocin intraperitoneally with a dose of 40 mg/kg/day for eight weeks. Blood samples were collected for measurement of blood glucose and creatinine levels. The Malondialdehyde (MDA) and nitrate contents of kidney also were assessed.

Results: Chronic hyperglycemia (blood glucose >400 mg/dL) significantly increased the blood creatinine of the diabetic group (4.51 ± 0.45 mg/dL) compared with normal rats (0.72 ± 0.09 mg/dL, $P < 0.001$). Hyperglycemia also decreased the nitrate content (37%) accompanied by an increase in the MDA content (13.00 ± 0.19 μ g/mg protein) compared with normal group (10.22 ± 0.54 μ g/mg protein). Crocin significantly decreased the blood creatinine of diabetic rats (1.12 ± 0.13 mg/dL, $P < 0.001$), accompanied by a decrease in blood glucose (9%). Finally, the content of MDA significantly decreased by 29% in diabetic treated rats compare to diabetic untreated rats ($P < 0.001$).

Conclusion: Based on the findings of the present study, it is appeared that crocin has a role in the prevention of diabetic nephropathy through inhibition of oxidative stress and reducing lipid oxidation.

Key words: Diabetes Mellitus, Crocin, Diabetic Nephropathy, Oxidative Stress, Hyperglycemia