

بررسی اثر میواینوزیتول و کروسین بر میزان ژن‌های RAGE و TGFβ در بافت کلیه رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

سمیه سادات حیدری*، دکتر فرشته بهمنی**، دکتر سیده زهرا بطحائی***، دکتر غلامرضا مشتاقی کاشانیان****

دریافت: ۹۲/۱۱/۲، پذیرش: ۹۳/۲/۳۰

چکیده:

مقدمه و هدف: نفروپاتی دیابتی از جمله عوارض طولانی مدت دیابت کنترل نشده به‌شمار می‌رود. ادامه یافتن افزایش قند خون منجر به تولید پروتئین‌های گلایک و فعال شدن مکانیسم‌های منتهی شونده به نفروپاتی دیابتی از طریق افزایش تولید گیرنده محصولات نهائی گلایک و TGFβ در بافت کلیه می‌شوند. در این مطالعه، به منظور یافتن ترکیباتی که بتوانند از بیان دو عامل اخیر جلوگیری کنند، اثر میواینوزیتول و کروسین بر روی میزان بیان گیرنده محصولات نهائی گلایک و TGFβ در بافت کلیه رت‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این مطالعه تجربی رت‌ها پس از ابتلا به دیابت توسط استرپتوزوتوسین، طی ۱۲ هفته با میواینوزیتول خوراکی ۱٪ و کروسین تزریقی ۱۰۰ BWmg/kg تیمار شده و میزان تغییرات بیان گیرنده محصولات نهائی گلایک و TGFβ در بافت کلیه با روش RT-PCR نیمه کمی بررسی گردید. داده‌های حاصل در گروه‌های مختلف با استفاده از روش‌های آماری One Way ANOVA و Tukey و توسط نرم افزار SPSS Version 18 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: میزان بیان گیرنده محصولات نهائی گلایک و TGFβ در بافت کلیه رت‌های دیابتی تیمار شده با کروسین در مقایسه با رت‌های دیابتی بدون تیمار کاهش معناداری پیدا کرد اما میواینوزیتول با دوز مورد مطالعه نتوانست تغییر معناداری در میزان بیان این دو ژن ایجاد کند.

نتیجه نهایی: یافته‌ها نشان می‌دهند که استفاده از کروسین توانائی کاهش عوارض ابتلا به دیابت و مسدود کردن مسیرهای ابتلا به نفروپاتی را داشته و این خصوصیت احتمالاً مرتبط با توانائی کاهش قند و محصولات نهایی AGE در سرم و خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب است. با توجه به اثرات مثبت میواینوزیتول در دیابت که در مطالعات قبلی نشان داده شده است، مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیزم اثر آن مورد نیاز است.

کلید واژه‌ها: اینوزیتول / کروسین / محصولات نهائی گلایک شده پیشرفته / نفروپاتی دیابتی

مقدمه:

دلایل ایجاد مرحله نهائی بیماری کلیوی است که در نهایت به ناتوانی و مرگ و میر بیماران دیابتی می‌انجامد (۲). بسیاری از اختلالات متابولیکی و همودینامیکی در دیابت از افزایش قند خون ناشی می‌شوند. از جمله این اختلالات می‌توان به تشکیل محصولات نهائی گلایک شده (Advanced Glycation End Products; AGEs) اشاره

عدم درمان مناسب و ادامه یافتن روند افزایش قند خون در بیماران دیابتی منجر به بروز اختلالاتی در عروق این بیماران گشته و می‌تواند زندگی آنان را تهدید نماید (۱). نفروپاتی دیابتی از جمله عوارض عروقی دیابت می‌باشد که در طولانی مدت پیشرفت کرده و از شایع‌ترین

* کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

** استادیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان

*** دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

**** دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان (moshtaghikashanian@hotmail.com)

افزایش پیدا می‌کند (۱۴-۱۲) بنابراین استفاده از ترکیباتی که بتوانند میزان بیان ژن های RAGE و TGFβ را کاهش دهند از شروع مکانیسم‌های نوروپاتی دیابتی جلوگیری به عمل می‌آورند.

کروسین از اجزای تشکیل دهنده زعفران و یکی از محدود کاروتنوئیدهای محلول در آب است و خواصی همچون محافظت از قلب و عروق، سیستم عصبی و ضد سرطانی برای آن شناخته شده است (۱۵) همچنین بهبود بخشی عملکرد سیستم ایمنی بر اثر مصرف کاروتنوئیدهای موجود در زعفران به صورت آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (۱۶). بررسی اثرات کاهندگی قندخون در عصاره آبی زعفران و کروسین نشان داده است که این ترکیبات نه تنها باعث کاهش قندخون، بلکه کاهش محصولات نهائی AGE و مقاومت به انسولین در رت های دیابتی می‌شوند (۱۷،۱۸). همچنین گزارش شده است که کروسین می‌تواند میزان هموگلوبین گلیکته شده SGPT, SGOT و کراتینین سرم رت‌های دیابتی را نسبت به گروه کنترل کاهش دهد (۱۹). مطالعه اثر عصاره زعفران بر سلولهای PC12 (سلول‌های مشتق شده از تومورهای کرومافینی آدرنال) به عنوان یک مدل نوروپاتی دیابتی در آزمایشگاه نشان می‌دهد که کاروتنوئیدهای موجود در زعفران می‌توانند به صورت بالقوه در درمان عارضه نوروپاتی دیابتی مفید باشند (۲۰). میواینوزیتول ماده‌ای است که در کلیه‌ها از گلوکز ساخته میشود و مشخص شده است که میزان آن در سرم دیابتی‌ها ۱۸٪ کاهش می‌یابد (۲۱). بررسی اثرات میواینوزیتول در برخی عوارض دیابت نشان می‌دهد که میواینوزیتول خوراکی میزان سوربیتول و میواینوزیتول درون عصب سیاتیک را افزایش داده و از سوی دیگر سرعت انتقال عصبی را در حیوانات دیابتی بهبود می‌بخشد (۲۲) و به دلیل خواص آنتی اکسیدانی و جلوگیری از گلیکته شدن پروتئین‌های لنز چشمی انسان احتمال به تاخیر افتادن آب مروارید توسط این ماده مطرح شده است (۲۳،۲۴).

توجه به ویژگی مشترک کاهش عوارض دیابت توسط میواینوزیتول و کروسین سبب مطالعه اثر تجویز آنها در بیان ژن‌های موثر در نوروپاتی دیابتی در این مطالعه شد.

روش کار:

در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی ویستار نر به مدت ۴ هفته جهت رسیدن به میانگین وزنی مورد نظر (227/9±14/2gf) و تطابق با محیط آزمایشگاه نگهداری

کرد (۳). با افزایش قند خون، گلوکز به صورت غیرآزمی با گروه آمین در پروتئین‌ها واکنش داده و در نهایت ساختارهای پیچیده‌ای به نام محصولات نهائی گلیکته شده پیشرفته بوجود می‌آیند (۴). AGE هایی که در گردش خون هستند با گیرنده خود در سطح سلول‌ها با نام گیرنده محصولات نهائی گلیکته (Receptor of Advanced Glycation End Products; RAGE) سبب اختلال در ویژگیهای سلولی همانند افزایش بیان Transforming Growth Factor-β و Nuclear Factor-κB; NF-κB Growth Factor Beta; می‌شوند (۵). فاکتور رشد TGFβ سبب القای ساخت بیشتر کلاژن نوع ۱ و ۴ شده و با جلوگیری از بیان پروتئوگلیکان‌ها موجب پلیمریزاسیون و افزایش غیر معمول ماتریکس خارج سلولی می‌گردد (۶). افتراق بافت اپی‌تلیالی به مزانژیومی همراه با افزایش تعداد و حجم انواع سلول‌های گلوامرولی و توبولی موجب ضخیم شدن غشای پایه توبولی و گلوامرولی و بروز علائم بالینی نوروپاتی از جمله کاهش پاکسازی و افزایش میکروآلبومین‌اوری می‌شوند (۷). ناهنجاریهایی که در اثر واکنش محصولات نهائی گلیکته با گیرنده خود ایجاد می‌شوند با از بین بردن واکنش بین AGE:RAGE روند معکوسی را در پیش خواهند گرفت (۷). نشان داده شده است که غیرفعال کردن ژن RAGE در مدل‌های موشی مبتلا به نوروپاتی دیابتی به طرز چشمگیری باعث سرکوب در تغییرات کلیوی از جمله افزایش تعداد سلولهای گلوامرولی، افزایش مزانژیوم و افزایش آلبومین اوری در مقایسه با موش‌های طبیعی می‌گردد (۸). به کارگیری آنتی بادی علیه RAGE نیز سبب کاهش روند افزایش وزن کلیه، حجم گلوامرولی، بسط مزانژیوم و همچنین کاهش ترشح آلبومین ادراری می‌شود و در عین حال پاکسازی کراتینین و ضخامت غشاء پایه را به حالت طبیعی باز می‌گرداند (۹) همچنین تحقیقات بر روی موش‌های دیابتی نوع ۱، نشان داده است که تجویز آنتی بادی علیه TGFβ سبب جلوگیری از افزایش حجم بافت کلیه، ایجاد ماتریکس مزانژیالی، افزایش بیان فیبرونکتین و کلاژن و همچنین اختلال در عملکرد کلیوی خواهد شد (۱۰). اگرچه بیان ژن RAGE در حالت عادی به میزان کمی در اندوتلیوم، عضلات صاف، مزانژیوم و مونوسیت‌ها بیان می‌شود (۱۱) اما به محض افزایش میزان محصولات نهائی گلیکته میزان بیان آن در شبکه، مزانژیوم و آئورت پستانداران نیز

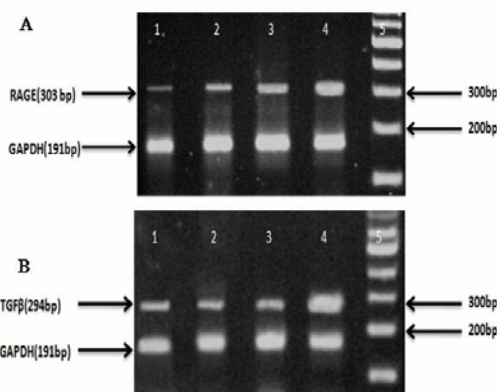
و تکثیر قطعه مورد نظر (واکنش PCR) با استفاده از پروتکل پیشنهادی شرکت فرمنتاز به ترتیب توسط RevertAid H Minus First St cDNA Syn Kit, PCR Master Mix(2x)-2, و Fermentase, Germany Thermal cycler توسط دستگاه Fermentase, Germany. انجام شد. کنترل داخلی (Bio Rad-USA Glyceroldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase; GAPDH) برای اندازه‌گیری نسبت میزان بیان ژن‌ها استفاده شد. پرایمرهای مناسب برای ژن‌های (Gene Bank: NC_005119), RAGE و (Gene Bank: NC_005103), TGFβ و کنترل داخلی (Gene Bank: NC_005103) و GAPDH توسط نرم‌افزارهای Oligo 6 و Gene Runner طراحی شدند. توالی پرایمرها به صورت رها بر و ۵'-CACTGGATAAAAGATGGCAC پرایمر رهبر و ۵'-GAGTCTGGGTTGTCGTTTTTC پرایمر پیرو برای ژن RAGE (اندازه محصول ۳۰۳ جفت باز) ۵'-TCAGCTCCACAGAGAAGAACTG پرایمر رهبر و ۵'-CGATCATGTTGGACAAGTCTC پرایمر پیرو برای ژن TGFβ (اندازه محصول ۲۹۴ جفت باز) و ۵'-AACGACCCCTTCATTGAC پرایمر رهبر و ۵'-TCCACGACATACTCAGCAC پرایمر پیرو برای ژن GAPDH (اندازه محصول ۱۹۱ جفت باز) بودند. مراحل چرخه دمایی به صورت: ۱- دمای ابتدایی جداشدن دو رشته: ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه ۲- دمای جداشدن دو رشته: ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه ۳- دمای هیبرید شدن پرایمرها به ژن‌ها: ۶۰°C برای ژن TGFβ، ۵۳°C برای ژن RAGE و در هر دو دمای ۵۳ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ژن GAPDH به مدت ۴۵ ثانیه به تعداد ۳۴ چرخه ۴- دمای پیشروی آنزیم پلیمرز: ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه ۵- دمای پیشروی نهایی آنزیم: ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. پس از انجام واکنش، محصولات PCR برای تعیین کمیت، روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده شده، به وسیله دستگاه ژل داک بررسی شدند و دانسیته باندهای ظاهر شده به وسیله نرم‌افزار آنالیز ژن (Fire Reader) بررسی و اندازه‌گیری شد. میزان دانسیته ژن مورد نظر نسبت به کنترل داخلی به صورت درصد به عنوان مبنای تغییرات میزان بیان ژن‌ها در مقایسه با گروه نرمال در نظر گرفته شد (۲۵،۲۶).

آنالیز آماری: تمامی داده‌ها و نمودارها به صورت (mean ± S.D) ارائه شدند. داده‌های حاصل در

شدند و سپس، گروهی از رت‌ها با تزریق ترکیب استریتوزوتوسین (STZ) با دوز ۶۵ mg/kg bodyweight در بافر سدیم سیترات ۰/۱ M با pH برابر با ۴/۵ به صورت درون صفاقی (i.p) دیابتی شدند (۲۴). ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ با اندازه‌گیری گلوکز خون، موش‌های صحرایی که گلوکز خون آنها بالاتر از ۱۵ mmol/L بود وارد مطالعه شدند (۲۴). موش‌های دیابتی به طور تصادفی به دو گروه بدون درمان و تحت درمان و در هر گروه ۱۵ سر (#۱۵) تقسیم شدند. موش‌های سالم نیز پس از تزریق بافر سیترات بدون STZ همانند موش‌های دیابتی به دو گروه بدون درمان و تحت درمان و در هر گروه ۱۰ سر (#۱۰) تقسیم شدند. موش‌های سالم و دیابتی یک هفته پس از اثبات دیابت، تحت تیمار با میواینوزیتول ۱٪ در آب‌خوری (تهیه شده از شرکت سیگما - آلمان) (۲۴) و کروسین تزریقی درون صفاقی با دوز ۱۰۰ mg/kg bodyweight در فواصل زمانی ۱۵ روز یک بار قرار گرفتند (۱۹). کروسین مورد استفاده در آزمایشگاه مطالعه حاضر از زعفران استخراج می‌شد (۲۴).

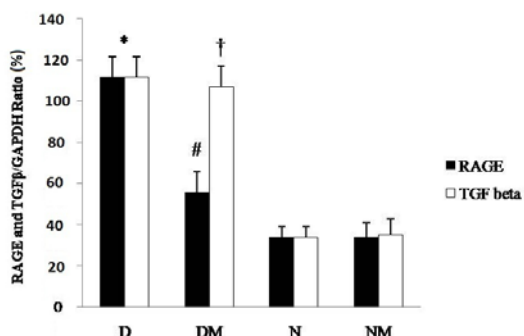
اندازه‌گیری تغییرات میزان بیان ژن‌های RAGE و TGFβ: در انتهای ۱۲ هفته تیمار با میواینوزیتول و کروسین، رت‌ها توسط کتامین بی‌هوش و سپس کشته شدند. به منظور استخراج RNA، مقدار ۱۰۰ میلی گرم از بافت تازه کلیه در ۱ میلی لیتر تریزول روی یخ هموزن گردید سپس در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول روئی، در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به فاز آبی حاوی RNA، ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل الکل افزوده و سپس در ۱۲۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب RNA حاصل با افزودن ۱ میلی لیتر اتانل ۷۵ درصد شستشو داده شد و پس از سانتریفیوژ در ۷۵۰۰g و دمای ۴ درجه سانتیگراد، در ۵۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز حل شد. بررسی کمی RNA استخراجی با استفاده از نانودراپ (Thermo scientific Nano drop 2000c Spectrophotometer, USA) و بررسی کیفی آن توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۲٪ انجام شد.

پس از استخراج RNA، ساخت DNA مکمل (cDNA) توسط پرایمر oligo-p(dt)15 و AMV reverse transcriptase



شکل ۲: عکس الکتروفوروز روی ژل آگارز مربوط به محصول PCR
A: تکثیر قطعه ژنی RAGE و کنترل داخلی GAPDH: B: تکثیر قطعه ژنی TGFβ و کنترل داخلی GAPDH. ستون ۱: گروه سالم بیمار شده با کروسین ستون ۲: گروه سالم بدون تیمار، ستون ۳: گروه دیابتی تحت تیمار با کروسین، ستون ۴: گروه دیابتی، ستون ۵: نشانگر جایگاه وزنی باندها

ادامه روند دیابت تا ۱۲ هفته در رت‌های دیابتی بدون تیمار که سبب شد تا میزان بیان ژن RAGE در این گروه نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معناداری پیدا کند ($P < 0.001$) در گروه کنترل تحت درمان با میواینوزیتول نتایج معناداری را نشان نداد و تیمار رت‌های دیابتی با میواینوزیتول منجر به کاهش معنادار این ژن در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار نشد ($P > 0.05$). میزان بیان ژن TGFβ در رت‌های دیابتی که میواینوزیتول دریافت کردند نیز کاهش معنادار نسبت به گروه دیابتی به‌همراه نداشت ($P > 0.05$) لیکن میزان بیان ژن TGFβ در اثر دیابت افزایش معناداری را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد ($P < 0.001$) (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳: نمودار مقایسه ای تغییرات بیان ژن RAGE و TGFβ نسبت به کنترل داخلی GAPDH در بافت کلیه رت‌های سالم، دیابتی و رت‌های سالم و دیابتی تیمار شده با میواینوزیتول

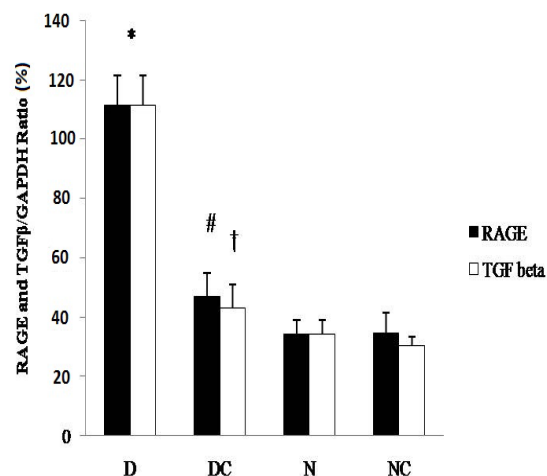
D رت‌های دیابتی، DM: رت‌های دیابتی تحت تیمار با میواینوزیتول، N: رت‌های سالم، NM: رت‌های سالم تحت تیمار با میواینوزیتول. * معناداری اختلاف بین گروه‌های دیابتی در مقایسه با سایر گروه‌ها ($P < 0.001$). # نبود معناداری اختلاف بیان RAGE بین گروه دیابتی تیمار شده با میواینوزیتول در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار ($P > 0.05$). †: نبود معناداری اختلاف بیان TGFβ بین گروه دیابتی تیمار شده با میواینوزیتول در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار ($P > 0.05$)

گروه‌های مختلف با استفاده از روش آماری ANOVA One Way و با استفاده از آزمون Tukey در SPSS 18 تجزیه و تحلیل شدند. اختلاف معنی دار بین گروه‌ها با سطح معنی داری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج:

نتایج بررسی تغییرات میزان بیان ژنهای RAGE و TGFβ:

نتایج آماری بدست آمده از آنالیز آماری در تعیین میزان تغییرات بیان ژن RAGE، نشان‌دهنده افزایش معنادار میزان بیان ژن RAGE در گروه رت‌های دیابتی نسبت به سایر گروه‌ها در انتهای مطالعه بود ($P < 0.001$) و کاهش معناداری در میزان بیان آن در رت‌های دیابتی که در طول مدت مطالعه کروسین دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده شد ($P < 0.05$) به طوری که میزان آن به گروه‌های سالم نزدیک شد. همین نتایج در رابطه با تغییرات بیان ژن TGFβ در گروه‌های دیابتی و گروه‌های کنترل به‌دست آمد. در حالیکه میزان بیان ژن TGFβ در گروه دیابتی بدون تیمار افزایش معناداری داشت ($P < 0.001$) میزان بیان این ژن در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با کروسین نسبت به گروه دیابتی بدون تیمار کاهش معناداری را نشان داد ($P < 0.001$) (شکل ۱ و ۲).



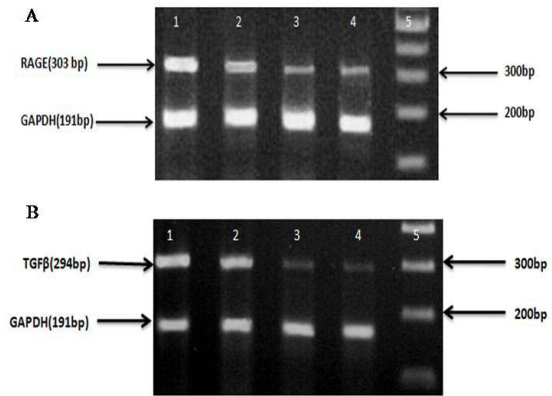
شکل ۴: نمودار مقایسه ای تغییرات بیان ژن RAGE و TGFβ نسبت به کنترل داخلی GAPDH در بافت کلیه رت‌های سالم، دیابتی و رت‌های سالم و دیابتی تیمار شده با کروسین

D رت‌های دیابتی، DC: رت‌های دیابتی تحت تیمار با کروسین، N: رت‌های سالم، NC: رت‌های سالم تحت تیمار با کروسین. * معناداری اختلاف بین گروه‌های دیابتی در مقایسه با سایر گروه‌ها ($P < 0.001$). # معناداری اختلاف بیان RAGE بین گروه دیابتی تیمار شده با کروسین در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار ($P < 0.005$). †: معناداری اختلاف بیان TGFβ بین گروه دیابتی تیمار شده با کروسین در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار ($P < 0.001$)

در رت‌های دیابتی با تزریق ۶۰ mg کروسین به مدت شش هفته نیز دلیل دیگری برای اثبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی این کاروتنوئید است (۲۷). از سوی دیگر، با بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌ها و مشاهده کاهش میزان تولید چاپرون Hsp 47 به عنوان مسئول شکل‌گیری کلاژن نوع چهارم، میزان بیان TGFβ و میزان هیپرتروفی گلومرولی در موش‌های ترانسژنیک مبتلا به نفروپاتی دیابتی (۲۸) و همچنین کاهش میزان AGE و رسپتور وابسته به آن در رت‌های دیابتی (۲۹،۳۰) قابل پیش‌بینی بود که کروسین نیز بتواند میزان بیان RAGE و TGFβ را به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی خود کاهش دهد. کاهش یافتن میزان قند خون، محصولات گلیک و کم‌کردن اثرات نامطلوب رادیکال‌های آزاد حاصل از استرس افزایش قند خون (۱۷،۱۸،۲۴)، مکانیسم‌های احتمالی هستند که کروسین از طریق آنها توانسته است میزان گیرنده مربوط به محصولات نهائی گلیک و TGFβ را در این مطالعه کاهش دهد.

مکانیسم دیگری که می‌توان برای اثر مشاهده شده در این مطالعه به آن اشاره کرد نقش بازدارندگی از تکثیر برخی ژن‌ها توسط کروسین است. در حقیقت کروسین با مهار میزان کلسیم سلولی به عنوان پیامبر ثانویه سبب می‌گردد تا برخی فرایندهای سلولی مانند تکثیر سلولی و بیان ژن صورت نگیرند (۳۱). در این صورت می‌توان احتمال داد که کروسین می‌تواند از بیان ژن TGFβ با همین مکانیسم مذکور جلوگیری کند. اگرچه در مطالعه حاضر شاخص‌های عملکرد کلیه بررسی نشده است اما با توجه به نقش کلیدی که هر دو ژن مورد مطالعه در بروز نفروپاتی دیابتی دارند و طولانی مدت بودن زمان تیمار در این مطالعه، می‌توان گفت که کروسین با کاهش بیان هر دو ژن در پیشگیری از عارضه طولانی مدت نفروپاتی دیابتی در دیابت نوع یک اثر مثبت خواهد داشت.

بر خلاف پیشینه مثبت میواینوزیتول در عوارض دیابت که پیش از این ذکر شد و در آزمایشگاه ما نیز به اثبات رسید (۲۴) میواینوزیتول به میزان ۱٪ در آب خوراکی به مدت ۱۲ هفته در رت‌های دیابتی نتوانست تأثیر معناداری در کاهش میزان بیان ژن‌های RAGE و TGFβ در مقایسه با گروه سالم داشته باشد. گروه سالم نیز با این دوز، تغییری در بیان ژن‌های مورد مطالعه نشان ندادند. این نتایج با توجه به نقش متابولیکی میواینوزیتول در



شکل ۴: عکس الکتروفوروز روی ژل آگارز مربوط به محصول PCR
A: تکثیر قطعه ژنی RAGE و کنترل داخلی GAPDH: B: تکثیر قطعه ژنی TGFβ و کنترل داخلی GAPDH. ستون ۱: گروه دیابتی، ستون ۲: گروه دیابتی تحت تیمار با میواینوزیتول، ستون ۳: گروه سالم، ستون ۴: گروه سالم تیمار شده با میواینوزیتول، ستون ۵: نشانگر جایگاه وزنی باندها

تیمار گروه‌های سالم با میواینوزیتول و کروسین هیچگونه تغییر معناداری در میزان بیان ژن‌های RAGE و TGFβ در مقایسه با گروه سالم بدون تیمار نداشت ($P > 0.05$).

بحث:

پس از ۱۲ هفته تیمار با کروسین تزریقی با دوز ۱۰۰ mg/kg bodyweight، کاهش معنادار در میزان بیان هر دو ژن RAGE و TGFβ در بافت کلیه رت‌های دیابتی تیمار شده با کروسین در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار مشاهده شد. همچنین کروسین با دوز مورد مطالعه تغییری در بیان ژن‌های مورد بررسی در رت‌های سالم تحت تیمار نداشت و مسمومیتی ایجاد نکرد. این یافته نشان‌دهنده ایمن بودن دوز انتخابی و مدت زمان مطالعه است. کاهش بیان ژن‌های RAGE و TGFβ نیز نشان‌دهنده اثر مثبت کروسین در جلوگیری از بروز فاکتورهای کلیدی در نفروپاتی دیابتی است و مکانیسم کاهش بیان ژن‌های مورد مطالعه قابل بررسی است.

تجویز عصاره زعفران در رت‌های دیابتی، موجب جلوگیری از افزایش قند خون و آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو حاصل از آن در کبد، میزان نیتروژن اوره خون، کراتینین و اسید اوریک سرمی می‌شود و بر این اساس پیشنهاد شده است که خواص بهبود بخشی عصاره زعفران و ترکیبات موجود در آن من جمله کروسین در کلیه و کبد مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی و زدودن رادیکال‌های آزاد است (۱۷،۲۴). کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در کبد و کلیه و همچنین کاهش میزان قند خون

محصولات AGE و پروتئین گیرنده در این بافت بررسی شود تا بتوان توجیه دقیقی برای عدم تغییر بیان ژن گیرنده AGE ارائه داد.

نفروپاتی دیابتی یکی از مشکلات تهدید کننده زندگی افراد دیابتی به شمار می رود و عوارض ناشی از دیابلیز و یا پیوند کلیه برای این بیماران هزینه های زیادی به آنان و جامعه تحمیل می کند. با توجه به نتایج این مطالعه مبنی بر کاهش بیان دو ژن RAGE و TGFβ که در بروز نفروپاتی دیابتی نقش کلیدی دارند، استفاده از کروسین به عنوان یک کاروتنوئید گیاهی که صناعی نیست و بدن آنها را به راحتی متابولیزه می کند می تواند به عنوان گزینه مناسبی برای ایجاد راهکارهای جلوگیری از بروز و پیشرفت نفروپاتی مورد بررسی قرار گیرد. اگرچه میواینوزیتول در این مطالعه در کاهش بیان ژن های RAGE و TGFβ تأثیری نداشت اما با توجه به اثرات مثبتی که میواینوزیتول در دیابت داشته است می توان دوزهای مختلف و مدت زمان های متفاوت، همچنین اندازه گیری پروتئین گیرنده با وسترن بلات و سایر مکانیزم ها را برای بررسی اثر آن در نفروپاتی دیابتی مورد نظر قرار داد.

نتیجه نهایی :

تجویز کروسین باعث کاهش بیان ژن های RAGE و TGFβ در بافت کلیه رت های دیابتی شده با ترکیب استرپتوزوتوسین در مقایسه با سایر رت ها شد ولی میواینوزیتول، اثری نداشت.

سپاسگزاری :

این مقاله نتیجه یک کار تحقیقاتی بوده و هیچ قسمتی از آن قبلاً در جایی منتشر نگردیده است. کمیته اخلاق پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و دانشگاه علوم پزشکی کرمان روش اجرای این طرح را بر اساس قوانین مصوب اروپا و آمریکا (EEC Directive of NIH publication #85-23, 1986; 86/609/EEC revised in 1985) تصویب نموده اند. نویسندگان نهایت تشکر خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس که امکانات لازم برای انجام تمامی آزمایشها را در آزمایشگاه دکتر بطحائی فراهم کرد و از دانشگاه علوم پزشکی کرمان که بخشی از هزینه های این تحقیق را متقبل شد، اعلام می دارند.

شرایط دیابت، همخوانی ندارد، زیرا در شرایط افزایش قند خون مانند دیابت، گلوکز به شکل یک مهارکننده رقابتی از جذب میواینوزیتول به درون سلول جلوگیری می کند (۳۲) و محتوای آن در سلول های مزانژیال گلوومرولی در اثر مواجهه با غلظت بالای گلوکز کاهش یافته و میزان ورود آن به درون سلول افزایش می یابد (۳۳). براین اساس، نشان داده شد که تولید پروکلاژن نوع یک و چهار، که ساخت آنها توسط TGFβ تحریک می شود و همچنین اندازه سلول های توبولی پروگسیمال با اضافه کردن میواینوزیتول به این سلول ها در حضور غلظت بالای گلوکز کاهش یافته و در نهایت از فیبروزه شدن کلیه جلوگیری می کند (۳۴). با توجه به نتیجه این تحقیقات انتظار می رفت که در مطالعه مدل حیوانی نیز شاهد کاهش TGFβ و RAGE باشیم، چرا که میواینوزیتول توانسته بود از ساخت کلاژن جلوگیری کرده و ساخت محصولات نهائی گلیکته را کاهش دهد (۲۴). مکانیسمی که در این رابطه مطرح می شود این است که احتمالاً میواینوزیتول به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی و شیرونی خود توانسته است این اثرات مثبت را در پی داشته باشد، زیرا پلی اول ها مانند میواینوزیتول به طور قطع می توانند رادیکال های آزاد هیدروکسیل را تشخیص داده و آنها را از بین ببرند (۳۵) و با افزودن آنها در شرایط شوک حرارتی، علی رغم کاهش بیان شپرون Hsp70، سلول باز هم می تواند در شرایط مطلوب باقی بماند (۳۶) اما نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده عملکرد مثبت میواینوزیتول در رابطه با کاهش بیان ژن های مورد مطالعه نبود. این نتیجه تنها با توجه به اثر میواینوزیتول ۱٪ در کاهش میزان افزایش یافته ی پمپ Na(+)-K(+) ATPase در رت های دیابتی و عدم تأثیر آن بر میزان قند خون، وزن افزایش یافته بافت کلیه و میزان کراتینین (۳۷) منطقی به نظر می رسد. از آنجا که ممکن است تغییرات پاتولوژیکی کلیوی به علت عوامل هورمونی و متابولیکی ناشی از افزایش قند خون باشد، کاهش نیافتن بیان ژن TGFβ و RAGE در مطالعه حاضر شاید به دلیل کمبود دوز مصرفی آن باشد، چنانکه در مطالعه ای نشان داده شد که مصرف دوز بیشتر میواینوزیتول به میزان ۲٪ در رت های دیابتی سبب کاهش نسبت پاکسازی گلوومرولی (Glomerular Filtration Rate)، آلبومین ادراری و دفع IgG و افزایش میزان جریان خون کلیه ناشی از دیابت می شود (۳۸) همچنین باید میزان

منابع:

- Jack M, Wright D. Role of advanced glycation endproducts and glyoxalase I in diabetic peripheral sensory neuropathy. *Transl Res* 2012;159(5):355-65.
- Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002;346(15):1145-51.
- Yamagishi S, Imaizumi T. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm Des* 2005;11(18):2279-99.
- Stitt AW. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br J Ophthalmol* 2001;85(6):746-53.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced glycation end products. *Circulation* 2006;114(6):597-605.
- Thallas-Bonke V, Lindschau C, Rizkalla B, Bach LA, Boner G, Meier M, et al. Attenuation of extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy by the advanced glycation end product cross-link breaker ALT-711 via a protein kinase c-alpha- dependent pathway. *Diabetes* 2004;53(11):2921-30.
- Ward DT, Yau SK, Mee AP, Mawer EB, Miller CA, Garland HO, et al. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(4):779-90.
- Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, Kato I, Harashima A, Yonekura H, et al. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin. *Diabetes* 2006;55(9):2510-22.
- Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Mogensen TH, Paludan SR, et al. Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice. *Diabetes* 2004;53(1):166-72.
- Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(Suppl 1):S55-7.
- Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233(1):4-11.
- Gill PS, Wilcox CS. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(9-10):1597-607.
- Li JM, Shah AM. ROS generation by non-phagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(Suppl 3):S221-6.
- Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(9):1656-66.
- Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010;50(8):761-86.
- Nair SC, Kurumboor SK, Hasegawa JH. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. *Cancer Biother* 1995;10(4):257-64.
- 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(7):1042-7.
- Shirali S, Bathayi S Z, Nakhjavani M, Ashoori MR. [Effects of saffron (*Crocus Sativus* L.) aqueous extract on serum biochemical factors in streptozotocin-induced diabetic rats]. *Iranian J Med Arom Plants* 2002;28(2):293-308 (Persian)
- 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;10(39):82-9.
- Mousavi SH, Tayarani NZ, Parsaee H. Protective effect of saffron extract and crocin on reactive oxygen species-mediated high glucose-induced toxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol* 2010;30(2):185-91.
- Cameron NE, Cotter MA, Dines K, Love A. Effects of aminoguanidine on peripheral nerve function and polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1992;35(10):946-50.
- Greene DA, De Jesus PV, Jr., Winegrad AI. Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J Clin Invest* 1975;55(6):1326-36.
- Ramakrishnan S, Sulochana KN, Punitham R. Two new functions of inositol in the eye lens: antioxidation and antiglycation and possible mechanisms. *Indian J Biochem Biophys* 1999;36(2):129-33.
- Bahmani F. Mechanisms of the effects of chemical chaperones on prevention of cataract in diabetic rats and their inhibitory effects on related-proteins' glycation. Ph.D thesis. Tarbiat Modares university, 2012.
- Arner RJ, Prabhu KS, Krishnan V, Johnson MC, Reddy CC. Expression of myo-inositol oxygenase in tissues susceptible to diabetic complications. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339(3):816-20.
- Ashrafi M, Bathaie SZ, Abroun S. High expression of cyclin D1 and p21 in N-Nitroso-N-Methylurea-Induced breast cancer in wistar albino female rats. *Cell J* 2012;14(3):193-202.
- Rajaei Z, Hadjzadeh MA, Nemati H, Hosseini M

- antioxidant activity of crocin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food* 2013; 16(3): 206-10.
28. Ohashi S, Abe H, Takahashi T, Yamamoto Y, Takeuchi M, Arai H, et al. Advanced glycation end products increase collagen-specific chaperone protein in mouse diabetic nephropathy. *J Biol Chem* 2004; 279(19):19816-23.
29. He S-Y, Qian Z-Y, Tang F-T, Wen N, Xu G-L, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life Sci* 2005;77(8):907-21.
30. Kim HY, Kang KS, Yamabe N, Yokozawa T. Comparison of the effects of Korean ginseng and heat-processed Korean ginseng on diabetic oxidative stress. *Am J Clin Med* 2008; 36(5): 989-1004.
31. He SY, Qian ZY, Tang FT, Wen N, Xu GL, Sheng L. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms. *Life Sci* 2005;77(8):907-21.
32. Olgemoller B, Schwaabe S, Schleicher ED, Gerbitz KD. Competitive inhibition by glucose of myo-inositol incorporation into cultured porcine aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Acta* 1990;1052(1):47-52.
33. Haneda M, Kikkawa R, Arimura T, Ebata K, Togawa M, Maeda S, et al. Glucose inhibits myo-inositol uptake and reduces myo-inositol content in cultured rat glomerular mesangial cells. *Metabolism* 1990;39(1):40-5.
34. Ziyadeh FN, Simmons DA, Snipes ER, Goldfarb S. Effect of myo-inositol on cell proliferation and collagen transcription and secretion in proximal tubule cells cultured in elevated glucose. *J Am Soc Nephrol* 1991;1(11):1220-9.
35. Smirnoff N, Cumbes QJ. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 1989; 28(4):1057-60.
36. Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell stress Chaperones* 1996;1(2):109.
37. Cohen AM, Wald H, Popovtzer M, Rosenmann E. Effect of myo-inositol supplementation on the development of renal pathological changes in the Cohen diabetic (type 2) rat. *Diabetologia* 1995;38(8):899-905.
38. Pugliese G, Tilton RG, Speedy A, Santarelli E, Eades DM, Province MA, et al. Modulation of hemodynamic and vascular filtration changes in diabetic rats by dietary myo-inositol. *Diabetes* 1990; 39(3):312-22. cysteine residues. *FEBS lett* 1992;310(1):63-5.

Original Article

Assessment of Myoinositol and Crocin Effects on RAGE and TGF β Gene Expression in the Kidney of Streptozotocin Induced Diabetic Rats

S. Sadat Heidary, M.Sc.^{*} ; F. Bahmani, Ph.D.^{**} ; Z. Bathaei, Ph.D.^{***}

Gh. Moshtaghi Kashanian, Ph.D.^{****}

Received: 22.1.2014

Accepted: 20.5.2014

Abstract

Introduction & Objective: Diabetic nephropathy is one of the micro vascular complications of uncontrolled diabetes. Chronic hyperglycemia results in the formation of glycated proteins and activation of pathways leading to diabetic nephropathy. Increasing RAGE and TGF β production in the kidney tissue is a major pathway involved in diabetic complications. In this survey, the effect of myoinositol and Crocin on RAGE and TGF β expression in the kidney of diabetic rats was studied.

Materials & Methods: In this experimental study after rendering rats with diabetes with streptozotocin, they were treated with oral 1% myoinositol and injection of 100 mg/kg BW crocin for 12 weeks. Changes in both RAGE and TGF β expressions in the kidney tissue were assessed by semi-quantitative RT-PCR method. The data was analyzed by SPSS 18 software and one way ANOVA and Tukey statistical tests.

Results: Crocin administration caused a significant reduction in the RAGE and TGF β expression in comparison with the untreated diabetic rats. Oral administration of myoinositol could not induce any significant changes in the expression of both genes in the diabetic rats.

Conclusion: According to the results of this study, crocin has the ability to block pathways leading to diabetic nephropathy through reducing RAGE and TGF β expression in the kidney tissue, maybe through its ability to reduce the serum glucose and AGEs, and antioxidant activity. Considering the positive effects of myoinositol in diabetic complications in previous studies, more studies are needed to find the mechanism of its action.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci 2014; 21 (2):122-130*)

Keywords: Crocin / Diabetic Nephropathy\ Inositol / Glycosylation End Products, Advanced

* M.Sc. in Biochemistry, Kerman University of Medical Sciences & Health Services, Kerman, Iran.

** Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine
Kashan University of Medical Sciences & Health Services, Kashan, Iran.

*** Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medical Sciences
Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

**** Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine
Kerman University of Medical Sciences & Health Services, Kerman, Iran. (moshtaghikashanian@hotmail.com)