

تأثیر آتورواستاتین بر پاسخ استرس اکسیداتیو و عملکرد کلیه در مدل تجربی نفروپاتی دیابتی

نسترن فقیهی^۱، محمدتقی محمدی^{۲*}، اکرم عیدی^۱

چکیده

زمینه و هدف: آتورواستاتین دارای اثر چندگانه مستقل از کاهش چربی‌ها همچون ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان است. تحقیق حاضر با هدف تعیین اثر آتورواستاتین بر عملکرد کلیه و پاسخ استرس اکسیداتیو کلیه در مدل تجربی نفروپاتی دیابتی انجام شد.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به صورت تصادفی به چهار گروه (۲۴ سر) شامل: نرمال، نرمال درمان، دیابتی، دیابتی درمان تقسیم شدند. موش‌ها با تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین (دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دیابتی شده و حیوانات درمان‌شونده، ۸ هفته آتورواستاتین (دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) دریافت کردند. در پایان آزمایش، نمونه‌های خونی جهت اندازه‌گیری گلوکز و کراتینین جمع‌آوری شدند. غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) و فعالیت آنزیم کاتالاز کلیه مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: هیپرگلیسمی مزمن کنترل‌نشده (گلوکز خون بالای ۵۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)، کراتینین حیوانات دیابتی (1.70 ± 0.30 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) را در مقایسه با حیوانات نرمال (0.40 ± 0.07 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)، به طور معنی‌داری افزایش داد ($p < 0.05$). همچنین هیپرگلیسمی موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز (۵۷٪) به همراه افزایش غلظت MDA (0.15 ± 0.02 نانومول بر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با گروه نرمال شد (0.04 ± 0.02 نانومول بر میلی‌گرم پروتئین). آتورواستاتین به طور معنی‌داری کراتینین خون حیوانات دیابتی (0.70 ± 0.20 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) را در مقایسه با گروه نرمال کاهش داد ($p < 0.05$). در نهایت، در حیوانات دیابتی درمان‌شده، فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش (۵۲٪) و غلظت MDA کاهش پیدا کرد (0.03 ± 0.01 نانومول بر میلی‌گرم پروتئین).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد آتورواستاتین قادر است سیستم آنتی‌اکسیدانی کلیه را طی نفروپاتی دیابتی تقویت کند. لذا به نظر می‌رسد آتورواستاتین با مهار تولید رادیکال‌های آزاد از نفروپاتی ناشی از هیپرگلیسمی جلوگیری می‌کند.

کلیدواژه‌ها: نفروپاتی دیابتی؛ آتورواستاتین؛ هیپرگلیسمی؛ استرس اکسیداتیو.

گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

محمدتقی محمدی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

mohammadi.mohammadt@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۸

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۱۶

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Faghihi N, Mohammadi MT, Eidi A. The effect of atorvastatin on oxidative stress and renal function in experimental model of diabetic nephropathy. Qom Univ Med Sci J 2016;9(11):1-11. [Full Text in Persian]

مقدمه

نفروپاتی دیابتی از جمله عوارض مهم دیابت شیرین است که عامل اصلی رسیدن به مرحله نهایی بیماری کلیوی در کشورهای غربی محسوب می‌شود (۱).

در طی این بیماری، اختلالات در ساختار و عملکرد کلیه در طی مراحل مختلف زمانی بروز می‌کند (۲). برای مثال در مراحل ابتدایی بیماری، تغییرات همودینامیک همچون افزایش فیلتراسیون گلومرولی (Glomerular Filtration Rate, GFR) و جریان خون کلیوی رخ می‌دهد. با گذشت زمان و پیشرفت بیماری، هیپرگلیسمی مزمن باعث تغییرات آسیب‌شناختی از جمله افزایش قطر غشای پایه گلومرولی و توبولی، گسترش ماتریکس سلول‌های مزانشیال و گلومرولواسکلروز می‌گردد (۳). این تغییرات باعث اختلال در عملکرد کلیه شده و منجر به افزایش اوره و کراتینین خون می‌شود. در نهایت، سد فیلتراسیون آسیب دیده و پروتئین اوری صورت می‌گیرد که از علائم اصلی بیماری نفروپاتی دیابتی است (۴). در نهایت، در مراحل پیشرفته و یا مراحل انتهایی بیماری، میزان GFR کاهش یافته و دفع پروتئین با شدت فراوان ادامه می‌یابد (۳،۲). هیپرگلیسمی مزمن یک فاکتور مهم و اساسی در ایجاد التهاب، تحریک آپوپتوز، تولید رادیکال‌های آزاد و بروز استرس اکسیداتیو در بافت کلیه است که نقش اساسی در ایجاد و پیشرفت بیماری نفروپاتی دارد (۵،۶). در شرایط طبیعی، مقدار تولید رادیکال‌های آزاد در کلیه با سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در حال تعادل است، درحالی‌که در شرایط پاتولوژیک از جمله بیماری نفروپاتی، میزان تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و منجر به آسیب‌های جدی در ساختار و عملکرد کلیه می‌شود (۷). طبق بررسی‌های اخیر محققین، هیپرگلیسمی منجر به کاهش بیان آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۸). یکی از این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم کاتالاز است که از افزایش تجمع پراکسید هیدروژن جلوگیری می‌کند. این آنزیم در شرایط هیپرگلیسمی، کاهش قابل توجهی پیدا کرده و منجر به کاهش تخریب پراکسید هیدروژن و در نهایت، تجمع رادیکال‌های آزاد در بافت کلیه می‌شود (۹). پژوهش‌های انجام‌شده اخیر، اثرات سودمند داروهای گروه استاتین را در جلوگیری و پیشرفت بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی،

مستقل از اثرات کاهش‌دهنده کلسترول خون گزارش کرده‌اند (۱۰-۱۳). استاتین‌ها جزء داروهای کاهش‌دهنده کلسترول به‌واسطه مهار آنزیم ۳- هیدروکسی-۳-متیل-گلوکوتاریل کوآنزیم-آ (HMG-CoA) ردوکتاز هستند که سبب مهار بیوسنتز کلسترول در کبد شده و در بیشتر موارد برای درمان بیماران مبتلا به اختلالات چربی استفاده می‌شوند (۱۴). یافته‌های اخیر نشان می‌دهند استاتین‌ها دارای چند اثر ویژه در بافت‌های مختلف بدن در شرایط پاتولوژیک بوده که از بین آنها می‌توان به اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی این داروها اشاره کرد (۱۰،۱۴،۱۵). براساس نتایج تحقیق Li و همکاران، اثرات آنتی‌اکسیدانی آتورواستاتین از بقیه استاتین‌ها بیشتر است (۱۵). همان‌طور که نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد داروی آتورواستاتین باعث کاهش تولید رادیکال‌های آزاد در بافت‌های مختلف بدن در شرایط دیابت و پرفشاری از جمله بافت پانکراس و مغز می‌شود (۱۶،۱۷). در تحقیق دیگری، Lu و همکاران نشان دادند افرادی که داروهای استاتین‌ها را مصرف می‌کنند دارای فعالیت‌های التهابی و اکسیداتیو پایین‌تری هستند (۱۸). همچنین طبق نتایج پژوهش‌های دیگر که در مدل تجربی نفروپاتی دیابتی انجام شده، اثرات مهار آتورواستاتین بر مهار تولید کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی به اثبات رسیده است (۱۴،۱۹). از آنجایی که براساس یافته‌های محققین، فرآیند التهاب و تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از هیپرگلیسمی، نقش اساسی در ایجاد نفروپاتی دیابتی دارد و اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی آتورواستاتین نیز به اثبات رسیده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر این دارو بر عملکرد کلیه، فعالیت کاتالاز و میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در مدل تجربی نفروپاتی دیابتی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) تهیه‌شده از مرکز پژوهشی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد.

با این تفاوت که در طی دوره آزمایش با داروی آتورواستاتین (به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت روزانه از طریق گاوآژ تیمار شدند.

در انتهای آزمایش، حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفته و پس از خونگیری از قلب، بافت‌های کلیه راست حیوان جدا و به دقت به وسیله ترازو توزین شدند و ایندکس وزن کلیه $[100 \times (\text{وزن حیوان/وزن کلیه})]$ به دقت محاسبه گردید. سپس به سرعت به داخل نیتروژن مایع و فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد انتقال یافت. سرم خون به وسیله دستگاه سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) جدا گردید. از سرم‌های جداشده، پارامترهای بیوشیمیایی کراتینین و گلوکز سرم به وسیله پروتکل کیت‌های شرکت پارس آزمون مورد سنجش قرار گرفت.

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها و میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، از روش Satho استفاده شد (۲۰). در ادامه، به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموزنه، ۱/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰٪ اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسیدتیوباربیتریک ۰/۶۷٪ به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری جوش قرار گرفت، سپس ۲ میلی‌لیتر ۱- بوتانل به محلول اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شد.

جذب محلول رویی صورتی‌رنگ به وسیله دستگاه اسپکتوفوتومتر (CECIL-2501, England) در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. غلظت MDA، با استفاده از ۱، ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد، تعیین و MDA برحسب نانومول بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. محلول استاندارد MDA در غلظت‌های ۰/۲-۲۰ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰٪ تهیه گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Abei استفاده شد (۲۱). به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۰/۰۱ میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر) اضافه و مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه گردید. سپس تریتون ۱۰۰ X - ۱۰٪ با غلظت نهایی ۱٪ افزوده شد. این محلول جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم به کار برده شد. واکنش با افزودن ۰/۰۵ میلی‌لیتر H_2O_2 ۳۰ میلی‌مولار به نمونه بافتی در

در تمامی آزمایشها شرایط کار با حیوانات آزمایشگاهی تعیین شده توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله 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 درجه سانتیگراد) در طی آزمایش نگهداری شدند. برای ایجاد دیابت قندی نوع اول از استرپتوزوتوسین (STZ) استفاده شد. حیوانات توسط داروی ترکیبی کتامین (۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس از محلول از پیش تهیه‌شده استرپتوزوتوسین (به میزان ۴۰ میلی‌گرم به‌ازای یک کیلوگرم وزن بدن) از راه ورید جانبی دم به حیوان تزریق گردید. ۵ روز بعد از تزریق، حیوانات با علائم پرنوشی و پرادراری مشخص شدند، و میزان قند خون آنها اندازه‌گیری شد. حیواناتی که گلوکز خون بالا داشتند (بالای ۵۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)، به‌عنوان حیوان دیابتی انتخاب و وارد دوره آزمایش شدند.

برای انجام پژوهش، حیوانات مورد آزمایش به‌صورت تصادفی در چهار گروه به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- گروه کنترل نرمال (N): این گروه شامل موش‌های صحرائی سالم بود که در طول آزمایش هیچ دارویی مصرف نکرده و تنها یک میلی‌لیتر آب مقطر روزانه به مدت ۲ ماه از طریق گاوآژ دریافت کردند.

۲- گروه نرمال دریافت‌کننده آتورواستاتین (N+T): حیوانات این گروه همانند گروه کنترل نرمال بودند با این تفاوت که به مدت ۲ ماه داروی آتورواستاتین را به میزان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت روزانه از طریق گاوآژ دریافت کردند.

۳- گروه کنترل دیابتی (D): دیابت نوع اول در حیوانات این گروه با تزریق درون وریدی استرپتوزوتوسین القا گردید. پس از ۵ روز از ثابت شدن علائم دیابت (پرنوشی، پرادراری و گلوکز خون بالا) از حیوانات این گروه به‌عنوان کنترل دیابتی استفاده شد. حیوانات این گروه در طول آزمایش، هیچ دارویی مصرف نکرده و تنها یک میلی‌لیتر آب مقطر روزانه به مدت ۲ ماه از طریق گاوآژ دریافت کردند.

۴- گروه دیابتی مصرف‌کننده آتورواستاتین (D+A): در این گروه، تمامی انجام مراحل آزمایش شبیه گروه کنترل دیابتی بود،

در نهایت، برش‌های تهیه‌شده آب‌گیری و شفاف‌سازی و فرآیند مانت کردن انجام شد. در پایان، لام‌های تهیه‌شده با دقت و با دستگاه میکروسکوپ نوری (Nikon) مورد ارزیابی قرار گرفت و با استفاده از دوربین مخصوص میکروسکوپ متصل به کامپیوتر (CMEX)، از نقاط مورد نظر تصویر تهیه گردید و شاخص‌های نکروز و آسیب گلومرولی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج آماری به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) ارائه گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

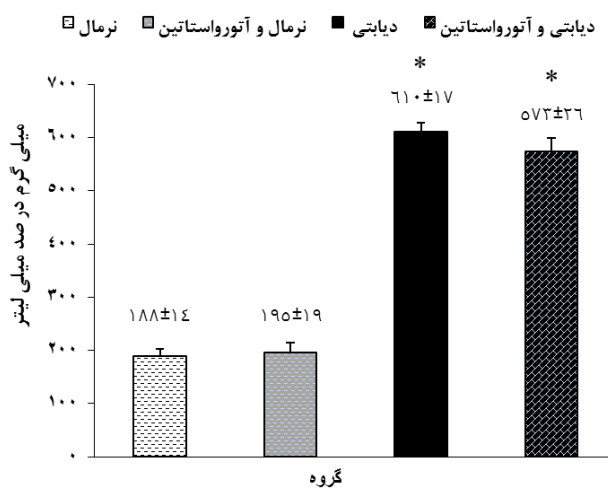
میزان گلوکز خون حیوانات گروه کنترل نرمال در پایان آزمایش، 188 ± 14 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود. استفاده از آتورواستاتین تأثیری بر گلوکز خون حیوانات سالم در حیوانات گروه کنترل نرمال درمان‌شده با آتورواستاتین در طول ۶۰ روز آزمایش نداشت. از طرفی، میزان گلوکز خون در حیوانات دیابتی بعد از گذشت ۶۰ روز از القای دیابت، به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (610 ± 17 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر). درحالی‌که مصرف آتورواستاتین به مدت ۶۰ روز در حیوانات دیابتی درمان‌شده، تغییر معنی‌داری در میزان گلوکز خون این حیوانات در مقایسه با حیوانات کنترل دیابتی ایجاد نکرد (نمودار شماره ۱).

بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار در $pH=7$ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت گردید. (یک واحد فعالیت کاتالاز؛ مقدار یک میکرومول از H_2O_2 بوده که در یک دقیقه تجزیه می‌شود). فعالیت آنزیم برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۲۲). در ادامه، حجم معینی از عصاره بافتی با رقت مناسب برداشته شد و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسید. سپس ۲ میلی‌لیتر 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آلبومین سرم گاوی (BSA) تهیه گردید. سپس غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آن ساخته و به‌عنوان غلظت‌های استاندارد به کار برده شد.

جهت مطالعه میکروسکوپی، ابتدا نمونه مورد نظر (بافت کلیه) به مدت ۲ هفته جهت تثبیت در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت، سپس بقیه مراحل به شرح زیر انجام شد. در ادامه، مراحل پاساژ بافت و قالب‌گیری با پارافین، طبق روش‌های روتین آماده‌سازی بافت صورت گرفت. مرحله برش‌گیری به‌وسیله دستگاه میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر انجام شد. سپس مقاطع تهیه‌شده در محل مورد نظر بر روی لام منتقل و برش‌ها با روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند.

گلوکز خون



نمودار شماره ۱: تغییرات غلظت گلوکز خون (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی.

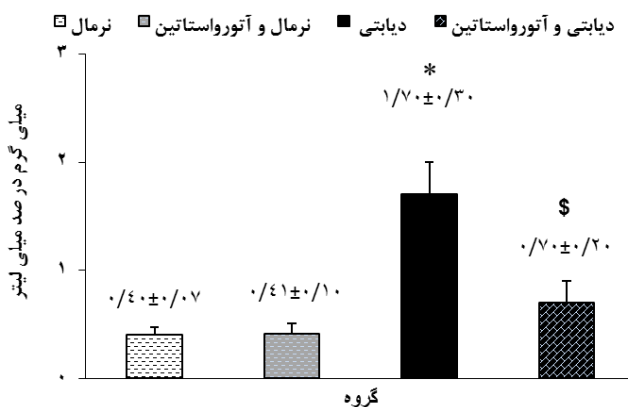
داده‌ها به صورت Means \pm SD نمایش داده شده است.

* نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.01$ در مقایسه با گروه نرمال و نرمال آتورواستاتین

القای دیابت، به طور معنی داری افزایش یافت و به میزان $1/7 \pm 3/3$ میلی گرم بر دسی لیتر رسید. درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۶۰ روز توانست میزان کراتینین خون حیوانات دیابتی درمان شده را به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش دهد (نمودار شماره ۲).

در گروه کنترل نرمال، میزان کراتینین خون $0/4 \pm 0/07$ میلی گرم بر دسی لیتر بود که مصرف آتورواستاتین در طول ۶۰ روز، تأثیر معنی داری در کراتینین خون حیوانات گروه کنترل نرمال درمان شده با آتورواستاتین ایجاد نکرد. در صورتی که میزان کراتینین خون در حیوانات کنترل دیابتی بعد از گذشت ۶۰ روز از

کراتینین خون



نمودار شماره ۲: تغییرات غلظت کراتینین خون (میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی.

داده‌ها به صورت Means \pm SD نمایش داده شده است.

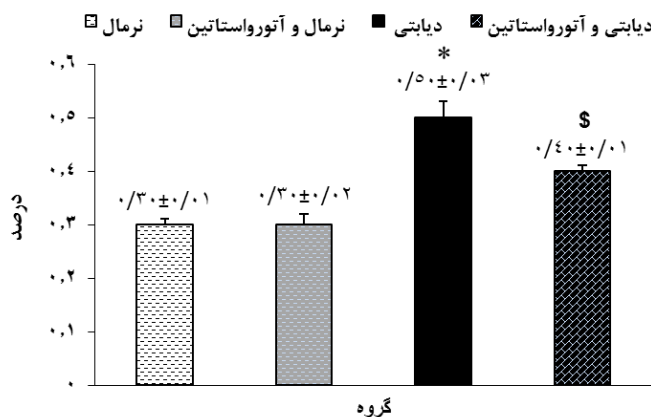
* نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0/05$ در مقایسه با گروه نرمال و نرمال آتورواستاتین

\$ نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی

در صورتی که میزان ایندکس وزن کلیه راست در حیوانات کنترل دیابتی بعد از گذشت ۶۰ روز از القای دیابت، به طور معنی داری افزایش یافت و به میزان $0/5 \pm 0/03$ رسید. درمان با داروی آتورواستاتین بعد از ۶۰ روز توانست میزان ایندکس وزن کلیه راست حیوانات دیابتی تحت درمان را به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی کاهش دهد (نمودار شماره ۳).

بر اساس نمودار شماره ۳ ایندکس کلیه راست در حیوانات گروه نرمال بعد از گذشت ۶۰ روز از دوره آزمایش برابر $0/3 \pm 0/01$ می‌باشد. مصرف آتورواستاتین در طول ۶۰ روز آزمایش، اثر معنی داری در ایندکس وزن کلیه راست حیوانات گروه نرمال درمان شده با آتورواستاتین در مقایسه با گروه نرمال ایجاد نکرد.

نسبت تغییرات وزن کلیه



نمودار شماره ۳: نسبت تغییرات وزن کلیه راست به وزن بدن (%) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی.

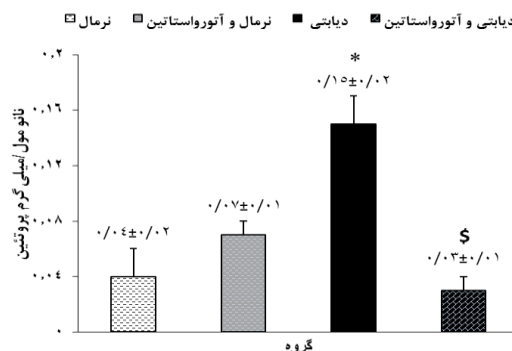
داده‌ها به صورت Means \pm SD نمایش داده شده است.

* نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0/05$ در مقایسه با گروه نرمال و نرمال آتورواستاتین

\$ نشانگر تفاوت معنی دار با $p < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی

گروه دیابتی درمان‌شده (0.03 ± 0.01) نانومول بر میلی‌گرم پروتئین) در مقایسه با گروه دیابتی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($p < 0.05$)، درحالی‌که درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۶۰ روز، هیچ تأثیر معنی‌داری در میزان MDA بافت کلیه گروه نرمال درمان‌شده در مقایسه با گروه کنترل نرمال ایجاد نکرد (نمودار شماره ۴).

غلظت مالون دی آلدئید



نمودار شماره ۴: تغییرات غلظت مالون دی آلدئید (MDA) بافت کلیه (نانومول/میلی‌گرم پروتئین) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی.

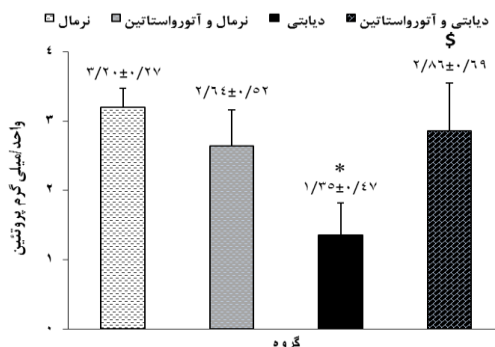
داده‌ها به‌صورت Means \pm SD نمایش داده شده است.

*: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه نرمال.

§: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه دیابتی.

درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۶۰ روز، به‌طور معنی‌داری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه دیابتی درمان‌شده (2.86 ± 0.69) واحد بر میلی‌گرم پروتئین) را در مقایسه با گروه دیابتی افزایش داد ($p < 0.05$)، درحالی‌که درمان با داروی آتورواستاتین به مدت ۶۰ روز، هیچ تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گروه نرمال درمان‌شده در مقایسه با گروه کنترل نرمال ایجاد نکرد (نمودار شماره ۵).

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز



نمودار شماره ۵: تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کلیه (واحد/میلی‌گرم پروتئین) در پایان آزمایش در گروه‌های مختلف آزمایشی. داده‌ها به‌صورت

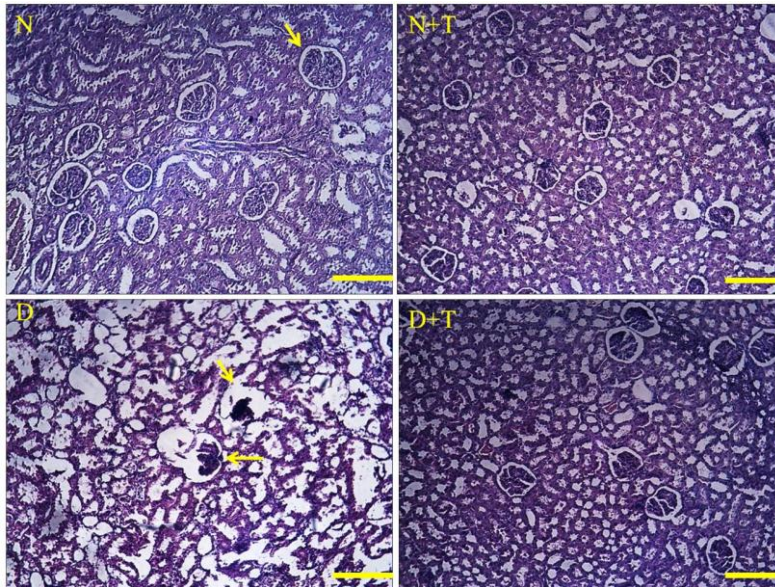
Means \pm SD نمایش داده شده است.

*: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه نرمال.

§: نشانگر تفاوت معنی‌دار با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه دیابتی.

در بافت کلیه مشاهده گردید. در صورتی که در حیوانات دیابتی درمان شده با آتورواستاتین، فضای گلومرولی، مویرگ‌ها و سلول‌های سازنده گلومرول‌ها و توبول‌ها همانند حیوانات گروه نرمال، سالم به‌نظر رسید (شکل).

در حیوانات گروه نرمال و نرمال درمان شده با آتورواستاتین؛ گلومرول، فضای کپسول بومن و شکل توبول‌ها در حالت طبیعی و سالم بود. در حیوانات گروه کنترل دیابتی، اتساع فضای کپسول بومن، گلومرولواسکلروز، کاهش تعداد گلومرول‌ها و افزایش گلومرول‌های تحلیل‌رفته در مقایسه با گروه‌های نرمال به‌وضوح



شکل: مقاطع عرضی بافت کلیه با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) در گروه‌های مختلف نشان داده شده است.

در تصاویر به‌دست آمده از حیوانات گروه‌های نرمال (N) و نرمال تحت درمان با آتورواستاتین (N+T)، گلومرول‌ها طبیعی هستند. در گروه کنترل دیابتی گلومرول‌ها آسیب‌دیده و گلومرولواسکلروز و آسیب توبولی به‌وضوح مشاهده می‌شود (D)، که میزان این آسیب در گروه درمان با آتورواستاتین کاهش یافته است (D+T). (100X, Scale bars= 100 μm)

بحث

به علاوه، در حیوانات دیابتی درمان شده، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش و غلظت MDA در بافت کلیه کاهش یافت. نتایج مطالعه حاضر، اثرات بهبودی بخش آتورواستاتین در جلوگیری از ایجاد و پیشرفت نفروپاتی در شرایط هیپرگلیسمی کنترل نشده را به‌خوبی نشان می‌دهد. گرچه این اثرات مثبت، مستقل از تغییرات گلوکز خون است، ولی در تحقیق حاضر استفاده از آتورواستاتین نتوانست بر میزان گلوکز خون، تأثیر معنی‌داری داشته باشد. براساس نتایج تحقیقات پیشین، آتورواستاتین بر میزان گلوکز خون حیوانات دیابتی بی‌تأثیر بوده است، هرچند در مورد بررسی نتایج مطالعات انجام شده در این زمینه، تناقض‌هایی وجود دارد (۱۷). ولی اکثر محققین معتقدند داروی آتورواستاتین و سایر استاتین‌ها بر گلوکز خون بی‌تأثیر است و یا حتی در موارد اندک، برخی محققین اعتقاد دارند این داروها باعث تشدید دیابت نیز می‌شود (۲۴،۲۵).

نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد هیپرگلیسمی، آغازگر و فعال‌کننده اصلی سیگنال‌هایی است که در پاتوژنز مولکولی نفروپاتی در دیابت قندی کنترل نشده نقش اساسی دارند و باعث ایجاد آسیب‌های شدید در ساختار و عملکرد کلیه می‌شوند (۳، ۱۹، ۲۳). در مطالعه حاضر، هیپرگلیسمی کنترل نشده نتوانست علائم نفروپاتی در حیوانات مورد آزمایش را ایجاد کند؛ چراکه 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 (MDA) در بافت کلیه افزایش و فعالیت آنزیم کاتالاز به‌عنوان یکی از آنزیم‌های مهم دفاع آنتی‌اکسیدانی کاهش نشان داد. همچنین درمان با آتورواستاتین نتوانست میزان کراتینین خون این حیوانات را به همراه تغییرات آسیب‌شناختی کاهش دهد.

هیپرگلیسمی مزمن که باعث آسیب به نفرون‌های کلیه و صدمه به سد فیلتراسیون می‌شوند تأکید شده است (۲۹،۱). طبق یافته‌های محققین، هیپرگلیسمی از طریق کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، سبب تجمع رادیکال‌های آزاد و بروز استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۶،۸). طبق نتایج Hwang و همکاران، آنزیم کاتالاز یکی از آنزیم‌های مهم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن بوده که در شرایط هیپرگلیسمی، کاهش قابل توجهی پیدا می‌کند (۹)، و از آنجا که این آنزیم سبب تجزیه پراکسید هیدروژن به آب می‌شود، لذا کاهش آن می‌تواند منجر به تجمع این رادیکال‌های آزاد سمی در بافت کلیه گردد. بر این اساس در مطالعه حاضر فعالیت این آنزیم در حیوانات دیابتی بدون درمان کاهش داشت که شاید علت آن را بتوان به افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در بافت کلیه (افزایش MDA) به دلیل کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در کلیه نسبت داد. همچنین مشخص شده است میزان بیان آنزیم NADPH-اکسیداز در شرایط هیپرگلیسمی زیاد شده و افزایش آن، نقش مهمی در افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در برخی شرایط پاتولوژیک در بدن دارد (۳۰).

در مطالعه حاضر، استفاده از آتورواستاتین به مدت ۲ ماه توانست میزان رادیکال‌های آزاد را در بافت کلیه کاهش دهد. طبق نتایج برخی تحقیقات، آتورواستاتین دارای خاصیت روشنی رادیکال‌های آزاد و ماهیت آنتی‌اکسیدانی است (۱۷،۱۵). همچنین در یک مطالعه دیگر مشخص گردید این دارو، میزان فعالیت آنزیم NADPH-اکسیداز را به شدت کاهش می‌دهد (۳۱). در مطالعه حاضر نیز آتورواستاتین توانست میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کلیه را در حیوانات دیابتی درمان‌شده افزایش دهد. در نهایت، طبق یافته‌های محققین، آتورواستاتین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را (به‌عنوان یکی از اجزای سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی) افزایش می‌دهد (۳۲). از آنجایی که طبق یافته‌های مطالعات اخیر، آتورواستاتین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و ضدالتهاب در سیستم‌های زیستی عمل می‌کند شاید بتوان گفت آتورواستاتین به دلیل کاهش رادیکال‌های آزاد و التهاب که نقش مهم در بروز نفروپاتی در حین هیپرگلیسمی مزمن دارند باعث کاهش علائم نفروپاتی دیابتی می‌شود. در راستای این نتایج، می‌توان به ایندکس وزن کلیه به‌عنوان فاکتور ادم و التهاب

نفروپاتی دیابتی دارای مراحل متعددی است و در مراحل اولیه بیماری، علائم بالینی خاصی دیده نمی‌شود (۲۶). با پیشرفت بیماری، تغییرات آسیب‌شناختی گسترده‌ای در بافت کلیه رخ می‌دهد که از جمله می‌توان به افزایش قطر یا ضخامت غشای پایه گلومرول‌ها و توبول‌های کلیوی اشاره کرد. با بروز این تغییرات، علائم بالینی بیماری، شروع به تظاهر می‌کند (۳). یکی از این علائم، افزایش میزان کراتینین خون است که در مطالعه حاضر نیز پس از ۲ ماه از گذشت دیابت، افزایش معنی‌داری در غلظت کراتینین خون مشاهده شد. نتایج تحقیقات مختلف نیز نشان می‌دهد افزایش کراتینین خون در دیابت با پیشرفت نفروپاتی زیاد همراه است. دلایل مختلفی می‌تواند باعث افزایش کراتینین خون شود که از جمله می‌توان به اختلال عملکرد کلیه به دلیل تخریب تعداد زیادی از گلومرول‌های کلیه و گلومرولواسکلروز اشاره کرد (۲۷). نتیجه بررسی‌های آسیب‌شناختی نیز به‌خوبی این تغییرات را نشان داده است. همچنین آسیب به مویرگ‌های گلومرولی 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 گلومرولی خواهد شد (۲۸). از آنجایی که کراتینین یک فاکتور وابسته به فیلتراسیون گلومرولی است به‌نظر می‌رسد کاهش فیلتراسیون به‌شدت، دفع کراتینین را تحت تأثیر قرار داده و منجر به افزایش کراتینین خون در مطالعه حاضر شده است. در مقابل، طبق نتایج این تحقیق، درمان طولانی‌مدت با داروی آتورواستاتین در طی هیپرگلیسمی می‌تواند میزان کراتینین پلاسما را کاهش دهد. این نتایج، نشانگر این مطلب است که احتمالاً داروی آتورواستاتین، از آسیب به سد فیلتراسیون در طی هیپرگلیسمی جلوگیری می‌کند؛ چراکه درمان با داروی آتورواستاتین، تأثیر معنی‌داری بر کاهش گلوکز خون ندارد. در راستای این یافته‌ها، می‌توان به نتایج بررسی‌های آسیب‌شناختی مبنی بر اینکه درمان با آتورواستاتین در حیوانات دیابتی تحت درمان می‌تواند از آسیب به گلومرول‌ها و بافت کلیه جلوگیری کند، اشاره نمود.

در مطالعه حاضر، میزان MDA بافت کلیه به‌عنوان شاخص ازدیاد رادیکال‌های آزاد، به مقدار زیادی افزایش یافت. در مطالعات گسترده‌ای به نقش مهم افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در حین

رادیکال‌های آزاد باعث کاهش علائم نفروپاتی دیابتی می‌شود.

بافت کلیه نیز اشاره کرد که در حیوانات دیابتی به دلیل هیپرگلیسمی مزمن و شدید افزایش یافته و آتورواستاتین آن را نیز به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نتیجه گیری

این مقاله قسمتی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. بدین وسیله از گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک دانشکده پزشکی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله جهت فراهم کردن مقدمات انجام پروژه حاضر، تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از خانم‌ها کفایت بقلانی، فاطمه سالم و مهسا صرامی به‌منظور همیاری و مساعدت در انجام تحقیق حاضر تقدیر می‌گردد.

براساس یافته‌های پژوهش حاضر، آتورواستاتین به‌طور مؤثری علائم نفروپاتی را در دیابت کنترل‌نشده کاهش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد آتورواستاتین از طریق افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز، و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بافت کلیه و جلوگیری از تجمع

References:

1. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros de Fuentes M, Garcia-Perez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2011;7(6):327-40.
2. Moeller MJ, Tenten V. Renal albumin filtration: Alternative models to the standard physical barriers. *Nat Rev Nephrol* 2013;9(5):266-77.
3. Rivero A, Mora C, Muros M, Garcia J, Herrera H, Navarro-Gonzalez JF. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 2009;116(6):479-92.
4. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 2013;124(3):139-52.
5. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther* 2012;30(1):49-59.
6. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: Atorvastatin versus pravastatin. *J Clin Lipidol* 2012;6(1):42-49.
7. Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res* 2010;2(3):316-31.
8. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(1):24-38.
9. Hwang I, Lee J, Huh JY, Park J, Lee HB, Ho YS, et al. Catalase deficiency accelerates diabetic renal injury through peroxisomal dysfunction. *Diabetes* 2012;61(3):728-38.
10. Luo JD, Zhang WW, Zhang GP, Zhong BH, Ou HJ. Effects of simvastatin on activities of endogenous antioxidant enzymes and angiotensin-converting enzyme in rat myocardium with pressure-overload cardiac hypertrophy. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23(2):124-8.
11. Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, Sharp BR, Hoffmeyer MR, Farvid AR, et al. HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2001;15(8):1454-6.
12. Kishi T, Hirooka Y, Konno S, Sunagawa K. Atorvastatin improves the impaired baroreflex sensitivity via anti-oxidant effect in the rostral ventrolateral medulla of SHRSP. *Clin Exp Hypertens* 2009;31(8):698-704.
13. Mooradian AD, Haas MJ, Batejko O, Hovsepian M, Feman SS. Statins ameliorate endothelial barrier permeability changes in the cerebral tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 2005;54(10):2977-82.

14. Grip O, Janciauskiene S, Bredberg A. Use of atorvastatin as an anti-inflammatory treatment in Crohn's disease. *Br J Pharmacol* 2008;155(7):1085-92.
15. Li J, Sun YM, Wang LF, Li ZQ, Pan W, Cao HY. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heart disease. *Clin Cardiol* 2010;33(4):222-7.
16. Mohammadi MT, Ramezani Binabaj M, Mirjalali MH, Ghaedniaye Jahromi M, Jafari M, Salem F. Effect of atorvastatin on pancreatic oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat. *Iran J Endocrinol Metab* 2013;15(2):203-10. [Full Text in Persian]
17. Mohammadi MT, Amini R, Jahanbakhsh Z, Shekarforoush S. Effects of atorvastatin on the hypertension-induced oxidative stress in the rat brain. *Iran Biomed J* 2013;17(3):152-7.
18. Lu L, Peng WH, Wang W, Wang LJ, Chen QJ, Shen WF. Effects of atorvastatin on progression of diabetic nephropathy and local RAGE and soluble RAGE expressions in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12(8):652-9.
19. Furukawa M, Gohda T, Tanimoto M, Tomino Y. Pathogenesis and novel treatment from the mouse model of type 2 diabetic nephropathy. *Sci World J* 2013;2013:1-8.
20. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978;90(1):37-43.
21. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
22. 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.
23. Luitse MJ, Biessels GJ, Rutten GE, Kappelle LJ. Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2012;11(3):261-71.
24. Mohammadi MT, Gaedniaye Jahromi M, Mirjalali MH, Ramezani Binabaj R, Jafari M, Salem F. Atorvastatin inhibits brain oxidative stress of Streptozotocin-induced diabetic rat. *J Exp Appl Animal Sci* 2013;1(1):35-43.
25. Koh KK, Sakuma I, Quon MJ. Differential metabolic effects of distinct statins. *Atherosclerosis* 2011;215(1):1-8.
26. Zhang Y, Shi Y, Liu Y, Dong H, Liu M, Li Y, et al. Growth pattern switch of renal cells and expression of cell cycle related proteins at the early stage of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363(1):159-64.
27. Perkins BA, Ficociello LH, Roshan B, Warram JH, Krolewski AS. In patients with type 1 diabetes and new-onset microalbuminuria the development of advanced chronic kidney disease may not require progression to proteinuria. *Kidney Int* 2010;77(1):57-64.
28. Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: A role for the glomerular endothelium? *Diabetologia* 2008;51(5):714-25.
29. Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev* 2010;3(2):101-8.
30. Rosa AP, Jacques CE, de Souza LO, Bitencourt F, Mazzola PN, Coelho JG, 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(1-2):159-67.
31. Bao XM, Wu CF, Lu GP. Atorvastatin attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered p38MAPK signaling. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(10):1392-8.
32. Gong X, Ma Y, Ruan Y, Fu G, Wu S. Long-term atorvastatin improves age-related endothelial dysfunction by ameliorating oxidative stress and normalizing eNOS/iNOS imbalance in rat aorta. *Exp Gerontol* 2014;52:9-17.

The Effect of Atorvastatin on Oxidative Stress and Renal Function in Experimental Model of Diabetic Nephropathy

Nastaran Faghihi¹, Mohammad Taghi Mohammadi^{2*}, Akram Eidi¹

¹Department of Biology, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Department of Physiology & Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Mohammad Taghi Mohammadi, Department of Physiology & Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
mohammadi.mohammadt@yahoo.com

Received: 28 Apr, 2015

Accepted: 6 Jun, 2015

Abstract

Background and Objectives: Atorvastatin has multiple effects independent of lipid lowering, such as anti-inflammatory and antioxidant. The present study was performed with the purpose of determining the effect of atorvastatin on renal function and oxidative stress response in experimental model of diabetic nephropathy.

Methods: In an experimental study, male Wistar rats were randomly divided into four groups (N=24): normal, normal treatment, diabetic, diabetic treatment. The rats were made diabetic by an intravenous injection of streptozotocin (40mg/kg) and the treated rats received atorvastatin for 8 weeks (at dose of 40mg/kg/day). At the end of the experiment, blood samples were collected to measure glucose and creatinine levels. The concentration of malondialdehyde (MDA) and the activity of renal catalase were assessed.

Results: Chronic uncontrolled hyperglycemia (blood glucose >500mg/dl) significantly increased the blood creatinine in diabetic group (1.70±0.30mg/dl) compared to normal animals (0.40±0.07mg/dl), (p<0.05). Also, hyperglycemia caused a decrease in the activity of catalase enzyme (57%) along with an increase in the MDA concentration (0.15±0.02nmol/mg protein) compared to normal group (0.04±0.02nmol/mg protein). Atorvastatin significantly decreased the blood creatinine of diabetic animals (0.70±0.20mg/dl) compared to normal group (p<0.05). Finally, in the treated diabetic animals, renal activity of catalase enzyme increased (52%) and MDA concentration decreased (0.03±0.01nmol/mg protein).

Conclusion: The findings of this study indicated that atorvastatin is able to strengthen the renal antioxidant system during diabetic nephropathy. Therefore, it appears that atorvastatin prevents hyperglycemia-induced nephropathy through the inhibition of free radical production.

Keywords: Diabetic nephropathy; Atorvastatin; Hyperglycemia; Oxidative stress.