

ارزیابی اثرات حفاظتی دی متیل فومارات بر سمیت کبدی و کلیوی موش‌های دیابتی ناشی از تزریق آلوکسان از مسیرهای التهاب و استرس اکسیداتیو

پریسا صابری حسن آبادی*^{۱،۲}

چکیده

مقدمه: دیابت شایع‌ترین بیماری متابولیک ناشی از کمبود نسبی ترشح یا عملکرد انسولین است. دیابت می‌تواند منجر به عوارض گوناگونی در بدن از جمله آسیب کبدی و کلیوی شود. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات حفاظتی دی متیل فومارات بر سمیت کبدی و کلیوی موش‌های دیابتی ناشی از تزریق آلوکسان از مسیرهای التهاب و استرس اکسیداتیو بود.

روش‌ها: موش‌های ماده از نژاد (C57BL/6) با تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات محلول در سرم فیزیولوژی (به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) در ۳ روز متوالی دیابتی شدند. موش‌ها به ۷ گروه ۵ تایی شامل گروه‌های دریافت‌کننده آلوکسان و دی متیل فومارات دسته‌بندی شدند. موش‌های دیابتی نوع اول با ۳ دوز از دی متیل فومارات (به ترتیب، ۲۰، ۴۰ و ۸۰) به مدت ۲۱ روز تحت درمان قرار گرفتند. سپس، آزمون‌های اختصاصی جهت ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی خون، نشانگرهای استرس اکسیداتیو، بیان ژن‌های التهابی (IL-6، TNF- α) و NF-kB) و ژن‌های مرتبط با پیشگیری از تشدید استرس اکسیداتیو و عوارض ناشی از دیابت (شامل بیان دو ژن Sirt-1 (سیرتوئین) و Nrf2) به کمک روش ریل تایم PCR انجام شد. در پایان، مشاهدات هیستوپاتولوژیکی در دو بافت کبد و کلیه موش‌ها هم ارزیابی گردید.

یافته‌ها: تجویز دی متیل فومارات به موش‌های دیابتی در یک رفتار وابسته به دوز منجر به کاهش معنادار سطوح گلوکز، AST، ALT و کراتینین خون در مقایسه با گروه شاهد شد. تغییرات هیستوپاتولوژیک کمتر و کاهش بیشتری در سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کلیه و کبد گروه‌های تیمار شده با دی متیل فومارات در مقایسه با موش‌های دیابتی مشاهده شد ($P < 0/001$). مواجهه با دی متیل فومارات به شکل معناداری موجب افزایش بیان ژن‌های Sirt-1 و Nrf2 و کاهش بیان ژن‌های دخیل در بروز التهاب نسبت به گروه دیابتی در هر دو بافت کبد و کلیه شد. **نتیجه‌گیری:** تجویز دی متیل فومارات موجب بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی خون، استرس اکسیداتیو، هیستوپاتولوژی و تعدیل مسیر بیان دو ژن Sirt-1 و Nrf2 در دو بافت کلیه و کبد موش‌های دیابتی شد.

واژگان کلیدی: دیابت، آلوکسان، دی متیل فومارات، استرس اکسیداتیو، پاسخ‌های ضدالتهابی، اثرات حفاظت از بافت کبدی-کلیوی

۱- گروه سم شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

***نشانی:** ساری، کیلومتر ۱۷ جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی، تلفن: ۰۱۱-۳۳۵۴۳۰۸۱-۳، پست الکترونیک: dr.parisasaberi@gmail.com

مقدمه

آنتی‌اکسیدانی می‌شوند [۴]. در یک مطالعه، Lone و همکاران (۲۰۲۰)، پتانسیل محافظت دی متیل فومارات در طی ابتلا به نفروپاتی دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین را در موش صحرایی و یستار بررسی نمودند. مهار شاخص‌های استرس اکسیداتیو در مدل‌های دیابتی موش پس از تجویز دی متیل فومارات مشاهده شد. در این مطالعه، اثرات ضددیابتی و محافظت‌کننده معنادار دی متیل فومارات در کاهش چربی و قند خون در طی ابتلا به نفروپاتی دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین در موش مشاهده شد [۵]. از آنجا که مطالعات در خصوص اثرات ضدالتهابی و ضددیابتی دی متیل فومارات محدود بوده و به‌ویژه تأثیر آن بر بیان ژن‌های التهابی و تعدیل مسیر بیان ژن‌های Sirt-1 و Nrf2 بررسی نشده است، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات حفاظتی دی متیل فومارات بر سمیت کبدی و کلیوی موش‌های دیابتی ناشی از تزریق آلوکسان از مسیرهای التهاب و استرس اکسیداتیو طراحی و به انجام رسید.

روش‌ها

مواد

از آلوکسان جهت القای دیابت در موش و متفورمین به‌عنوان داروی کنترل استفاده شد. آلوکسان از شرکت سیگما آلد ریچ (سنت لوئیس، آمریکا) خریداری شد. معرف ترایزول و متفورمین از شرکت داروسازی راموفارمین (تهران، ایران) خریداری شد. دی متیل فومارات از تکریس نئورامین (بريستول، انگلستان) خریداری شد. کیت‌های تخمین سطوح گلوکز، آلبومین و کراتینین خون از شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی هم از تأمین کنندگان تجاری استاندارد به‌دست آمد. مواد شیمیایی مورد استفاده برای انجام این تحقیق دارای کیفیت آزمایشگاهی مطلوبی بوده و محلول‌های شیمیایی در هر بار قبل از استفاده به‌صورت تازه تهیه شدند.

نمونه‌های مورد بررسی، روش نمونه‌گیری و طراحی مطالعه

موش‌های صحرایی ماده از نژاد (C57BL/6) با سن ۶ تا ۸ هفته (وزن بدن در محدوده $1 \pm 30-25$ g) تحت شرایط نگهداری استاندارد در اتاقی با دوره ۱۲ ساعته تاریکی/روشنایی، دمای 22 ± 2 °C و با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. تمام مراحل نگهداری و انجام آزمایشات برطبق

دیابت، شایع‌ترین بیماری متابولیک ناشی از کمبود نسبی ترشح یا عملکرد انسولین است. بر پایه بررسی‌های کمیته جهانی دیابت، تعداد افراد مبتلا به این بیماری تا سال (۲۰۳۰) ممکن است به مرز ۵۵۲ میلیون نفر هم برسد [۱]. عوارض دیابت به دو گروه عوارض کوتاه مدت و بلندمدت و مزمنی چون آسیب‌های قلبی، کلیوی و کبدی تقسیم می‌شود. نارسایی کلیوی از شایع‌ترین عوارض میکروواسکولار (تخریب رگ‌های خونی کوچک نظیر مویرگ‌ها) در طی ابتلا به دیابت است که بیش از یک-سوم از بیماران دیابتی آن را تجربه کرده‌اند. دیابت با استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن، هیدروکسیل یا کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن ارتباط مستقیمی دارد. استرس اکسیداتیو ناشی از قندخون بالا در پیشرفت عوارض دیابت از جمله نفروپاتی هم دخیل است. افزایش قندخون در بیماران دیابتی سبب تولید بیشتر گونه‌های فعال اکسیژن در بدن می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیشرفت دیابت داشته و مسیر التهابی به‌عنوان مهم‌ترین هدف در این سمیت مطرح شده است که در نهایت منجر به آسیب بافتی کلیه و کبد می‌شود. تولید گونه‌های فعال اکسیژن از مسیر زنجیره تنفسی در سلول‌ها و بیان ژن‌های التهابی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در میتوکندری، یکی از چند علت اصلی آسیب‌های بافتی ناشی از قند خون بالا است. عدم وجود دفاع مناسب آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به فعال‌شدن مسیر پیام‌رسانی وابسته به استرس اکسیداتیو بشود [۲، ۳]. به‌علت پیچیدگی و ابعاد مختلف بیماری دیابت، شبیه‌سازی مدل‌های حیوانی آن بایستی که با دقت زیادی صورت گرفته و به شکل ایده‌آل جهت نمایش تنوع قابل مشاهده در عوارض مربوط به این بیماری از بیش از یک مدل حیوانی استفاده شود. استرپتوزوتوسین و آلوکسان از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین ترکیبات شیمیایی مورد استفاده جهت القای دیابت محسوب می‌شوند.

دی متیل فومارات با نام تجاری Tecfidera به‌عنوان یک استر اسیدفوماریک، ترکیبی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است که تجویز آن در سال (۲۰۱۳) در درمان مولتیپل اسکلروزیس و پسوریازیس تأیید شده است. دی متیل فومارات به‌عنوان یک پیش‌دارو، بلافاصله در داخل بدن به مونومتیل-فومارات هیدرولیز می‌شود. هر دو نوع از فومارات‌ها سبب فعال‌سازی مسیر فاکتور هسته‌ای اریترئوئید-۲ مرتبط با فاکتور-۲ (Nrf2) به‌عنوان یک فاکتور رونویسی مهم در بروز پاسخ

ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی خون

نمونه‌گیری در یک زمان مشخص انجام شد. سطوح اوره و کراتینین خون با استفاده از کیت تشخیصی مخصوص (شرکت پارس آزمون ایران) سنجیده شد. به منظور اندازه‌گیری آلبومین خون هم از روش اتصال به رنگ برموکروزول سبز استفاده (کیت برموکروزول شرکت پارس آزمون) شد. غلظت گلوکز خون ناشتا به روش آنزیماتیک با استفاده از اسپکتروفتومتر و به کمک کیت‌های تجاری پارس-آزمون اندازه‌گیری شد. به منظور سنجش گلوکوتایون احیاء در نمونه، ۱ میلی‌لیتر از بافت مورد نظر را برداشته و به آن ۰/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد اضافه کرده و بعد از ورتکس کردن، به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ کردیم. یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی را برداشته و به آن ۲ میلی‌لیتر دی‌سدیم هیدروژن فسفات ۰/۳ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر DTNB درصد اضافه کرده و ورتکس نمودیم. سپس، محلول را ۱۵ دقیقه گرمخانه گذاری کرده تا واکنش کامل شود. میزان جذب را در طول موج ۴۱۲ نانومتر خواندیم. غلظت گلوکوتایون از منحنی استاندارد گلوکوتایون برحسب $\mu\text{g/ml}$ به دست آمد [۸]. سنجش فعالیت دو آنزیم ALT و AST توسط دستگاه اتوآنالیزور و با استفاده از کیت‌های آنزیمی انجام شد.

ارزیابی بافت کبد و کلیه در موش‌های صحرائی

به منظور ارزیابی میکروسکوپی، نمونه‌های بافتی به ابعاد تقریباً یک سانتی‌متر مربع از کلیه و کبد هر حیوان جدا شده و در ظرف‌های حاوی فرمالین ۱۰ درصد نگه‌داری شد. مراحل پاساژ بافتی (توسط دستگاه پردازش بافت شامل تثبیت، آبگیری، شفاف‌سازی و آغشتگی)، تهیه بلوک‌های پارافینی و برش‌های ۵ میکرونی (با استفاده از میکروتوم دوار و ۱۰ برش از هر نمونه با ضخامتی مشابه) و به روش هماتوکسیلین-انوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (با دُرشت نمایی $\times 40$) متصل به مانیتور و مجهز به دوربین عکاسی ارزیابی شد [۹]. برای ارزیابی تغییرات بافتی از هر موش سه لام و از هر لام ۱۰ فیلد میکروسکوپی به وسیله میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

ارزیابی نشانگرهای استرس اکسیداتیو در کلیه و کبد

کلیه و کبد موش‌ها شسته و در بافر مانیتول همگن شدند. مایع رویی در سانتریفیوژ ($5000 \times \text{گرم}$) جمع‌آوری شد و رسوبات (در مرحله دوم سانتریفیوژ با دور $11000 \times \text{گرم}$) برای ارزیابی

پروتکل‌های کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد (کُد اخلاق: IR.MAZUMS.4.REC.1401.11716).

موش‌ها به ۷ گروه ۵ تایی تقسیم و گروه‌های دریافت‌کننده آلوکسان و دی متیل فومارات به صورت زیر دسته‌بندی شدند: گروه ۱: کنترل منفی (نرمال سالین)، تزریق داخل صفاقی، به مدت ۳ هفته روزی یکبار.

گروه ۲: دیابتی، آلوکسان، تزریق داخل صفاقی (120 mg/kg).

گروه ۳: آلوکسان+دی متیل فومارات (20 mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۳ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۴: آلوکسان+دی متیل فومارات (40 mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۳ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۵: آلوکسان+دی متیل فومارات (80 mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۳ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۶: دی متیل فومارات (80 mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۳ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۷: آلوکسان+متفورمین (200 mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۳ هفته متوالی روزی یکبار.

در پایان ۲۱ روز، موش‌ها با کنامین/زایلازین (40 میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) بیهوش شده و بافت‌های کبد و کلیه آنها با لاپاراتومی جدا شدند. ابتدا بافت‌های خارج شده را با بافر سرد مانیتول (مانیتول $0/255 \text{ M}$ ، ساکاروز 74 mM ، EDTA $0/2 \text{ mM}$) شستشو داده و سپس با پیچی بافت‌ها تکه تکه و به کمک هموزنایزر برقی هموزن شدند. بافت هموزن شده به میکروتیوب‌ها انتقال داده شد و در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای 4°C ، ابتدا با سرعت $2000 \times \text{g}$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت (مایع رویی) به دست آمده برای انجام آزمایشات بافتی مورد استفاده قرار گرفت [۶]. تعداد موش‌ها و دوز ترکیبات مورد استفاده در این بررسی بر مبنای مطالعات قبلی انتخاب شدند [۶، ۵].

تزریق آلوکسان و القای دیابت (نوع اول)

موش‌ها با تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات محلول در سرم فیزیولوژی به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در سه روز متوالی دیابتی شدند. ملاک دیابتی شدن، سطح گلوکز خون بالای ۱۸۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود [۷].

استخراج RNA از بافت‌ها با استفاده از کیت استخراج RNA ستونی (شرکت یکتا تجهیز آزما) صورت گرفت. پرایمر برای ژن‌های مورد مطالعه، با استفاده از برنامه Primer-Blast در NCBI طراحی شد و از شرکت پیشگام خریداری گردید. توالی این پرایمرها و برنامه دمایی مورد استفاده در جدول ۱ قابل مشاهده است. از ژن GAPDH به عنوان رفرنس استفاده شد. سنجش بیان ژن‌ها با محاسبه $\Delta\Delta CT$ ، ΔCT و در نهایت رسم نمودارها بر حسب $2^{-\Delta\Delta Ct}$ جهت محاسبه تغییرات بیان ژن در نمونه‌ها انجام شد. تمامی ژن‌های منتخب در این مطالعه منطبق و مکمل بر مطالعات گذشته بود [۵، ۶، ۱۲].

پروتئین کربونیل، گلوکاتیون و محتوای مالون دی‌آلدید (MDA) در بافر تریس توزیع شد. سطح گلوکاتیون و محتوای MDA به روش اسپکتروفتومتری تجزیه و تحلیل شد [۱۰]. به منظور ارزیابی محتوای گلوکاتیون از معرف ۵،۵-دیتیویس (۲-نیتروبنزویک اسید) (به عنوان شاخص) استفاده و مقدار جذب در ۴۱۲ نانومتر محاسبه شد [۱۱].

سنجش بیان ژن‌ها

پس از بیهوش کردن حیوانات، ۳۰۰ mg از بافت‌های کبد و کلیه با سرم مانتول شستشو داده شده و درون میکروتیوب‌های حاوی محلول محافظت کننده RNA قرار داده شد و تا زمان استخراج RNA در فریزر با دمای $^{\circ}C -80$ نگهداری شد.

جدول ۱- برنامه دمایی و پرایمرهای مصرفی در بررسی التهاب به روش q-RT PCR

Genes	Primer	Real-Time PCR program
TNF- α	Desalted F: CGTGGAACTGGCAGAAGAG 0.02 μ mol R: CACCATTGGGAACCTCTCATC	95 $^{\circ}C$, 15 min, 10 cycles (95 $^{\circ}C$, 25 s; 60 $^{\circ}C$, 0.6 $^{\circ}C$ /cycle, 25 s; 72 $^{\circ}C$, 20 s (30 cycles (95 $^{\circ}C$, 25 s; 54 $^{\circ}C$, 25 s; 72 $^{\circ}C$, 20 s) 72 $^{\circ}C$, 5 min
IL-6	Desalted F: CAGACCTGTCTATACCACTTCAC 0.02 μ mol R: GCAAGTGCATCATCGTTGTTC	95 $^{\circ}C$, 15 min, 15 cycles (95 $^{\circ}C$, 25 s; 60 $^{\circ}C$, 0.5 $^{\circ}C$ /cycle, 30 s; 72 $^{\circ}C$, 30 s (35 cycles (95 $^{\circ}C$, 25 s; 52.5 $^{\circ}C$, 25 s; 72 $^{\circ}C$, 30 s) 72 $^{\circ}C$, 5 min
NF- κ B	Desalted F: GGTGGAGGCATGTTTCGGTAG 0.02 μ mol R: CCTGCGTTGGATTTCGTGAC	95 $^{\circ}C$, 15 min, 8 cycles (95 $^{\circ}C$, 25 s; 60 $^{\circ}C$, 1 $^{\circ}C$ /cycle, 30 s; 72 $^{\circ}C$, 30 s (40 cycles (95 $^{\circ}C$, 25 s; 57 $^{\circ}C$, 30 s; 72 $^{\circ}C$, 30 s) 72 $^{\circ}C$, 5 min
Nrf2	Desalted F: GCATGATGGACTTGGAGTTGC 0.02 μ mol R: TTCCTTCTGGAGTTGCTCTTGT	95 $^{\circ}C$ for 2 min (initial denaturation), 40 cycles [95 $^{\circ}C$ for 5 sec (denaturation), 63 $^{\circ}C$ for 30 sec (annealing & extension)], Melting curve 74 $^{\circ}C$ (1 $^{\circ}C$ /5 sec)
Sirt1	Desalted F: CGGTATCTATGCTCGCCTTGC 0.02 μ mol R: CAGAGACGGCTGGAACCTGTC	95 $^{\circ}C$ for 2 min (initial denaturation), 40 cycles [95 $^{\circ}C$ for 5 sec (denaturation), 61 $^{\circ}C$ for 30 sec (annealing & extension)], Melting curve 72 $^{\circ}C$ (1 $^{\circ}C$ /5 sec)

ارزیابی آماری (۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به طور معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). این در حالی است که سطح گلوکز خون در موش‌های دیابتی تیمار شده با ۳ دوز از دی متیل فومارات (۲۰ mg/kg/day، ۴۰ و ۸۰) در مقایسه با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg/day) به طور معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). همچنین، سطح گلوکز در گروه تحت تیمار با متفورمین هم در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با دی متیل فومارات به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$).

اثر دی متیل فومارات بر AST

چنانکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود، سطح AST در گروه تیمار شده با آلوکسان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش یافت ($P < 0/001$). سطح این آنزیم در ۳ گروه تیمار شده با دی متیل فومارات (۲۰ mg/kg/day، ۴۰ و ۸۰) در مقایسه با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg/day) کاهش یافت که این روند کاهشی در ۲

ارزیابی آماری

اطلاعات آماری حاصل از این پژوهش به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. نمودارهای حاصل توسط برنامه پریسم نسخه ۸ و با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت. از تست توکی به منظور مقایسه اختلاف بین گروه‌های مختلف استفاده شده و حدود معناداری در سطح آماری ($P < 0/05$)، تعریف شد. از آزمون آماری کولموگروف-اسمیرنوف برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

اثر دی متیل فومارات بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون

اثر دی متیل فومارات بر گلوکز خون

نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که سطح گلوکز خون در گروه کنترل دیابتی با تزریق آلوکسان

متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت.

اثر دی متیل فومارات بر کراتینین

سطح کراتینین در گروه کنترل دیابتی (دریافت کننده آلوسان ۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). سطح کراتینین در ۳ گروه دریافت کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت. سطح کراتینین در گروه دریافت کننده متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت.

اثر دی متیل فومارات بر سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو

اثر دی متیل فومارات بر محتوای مالون دی‌آلدهید کلیه

سطح مالون دی‌آلدهید در گروه کنترل دیابتی (دریافت کننده آلوسان ۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). سطح مالون دی‌آلدهید در ۳ گروه دریافت کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). همچنین، سطح مالون دی‌آلدهید در گروه دریافت کننده متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۲ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰ mg/kg/day و ۴۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت. این کاهش در مقایسه با گروه دریافت کننده دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg/day) معنادار نبود (شکل ۲).

گروه تیمار شده با دی متیل فومارات (۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) معنادار بود ($P < ۰/۰۰۱$). سطح AST در گروه تیمار شده با متفورمین در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده دی متیل فومارات (۲۰ و ۴۰ mg/kg/day) به طور معناداری کاهش یافت.

اثر دی متیل فومارات بر ALT

سطح ALT در گروه تیمار شده با آلوسان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). سطح این آنزیم در ۳ گروه تیمار شده با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسان (۱۲۰ mg/kg/day) کاهش یافت که این روند کاهش در ۲ گروه تیمار شده با دی متیل فومارات (۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) معنادار بود ($P < ۰/۰۰۱$). سطح ALT در گروه تیمار شده با متفورمین در مقایسه با گروه‌های دریافت کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت.

اثر دی متیل فومارات بر آلبومین

سطح آلبومین در گروه کنترل دیابتی (دریافت کننده آلوسان به میزان ۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). سطح آلبومین در گروه دریافت کننده دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری افزایش یافت. سطح آلبومین در گروه دریافت کننده متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) به شکل معناداری افزایش یافت.

اثر دی متیل فومارات بر اوره

سطح اوره در گروه کنترل دیابتی با تزریق آلوسان (۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۱$). سطح اوره در ۳ گروه دریافت کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت. سطح اوره در گروه دریافت کننده

جدول ۲- تغییرات در پارامترهای بیوشیمیایی خون در گروه‌های مختلف موش

گروه‌های تحت تیمار	گلوکز خون (mg/dL)	اوره (mg/dL)	کراتینین (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	آلبومین (g/dL)
گروه اول	۳/۳±۱۰/۱/۸	۹/۳±۵۵/۲	۰/۴	۱/۲±۳۲/۴۲	۴/۵±۳۹/۳	۰/۴±۴/۰۶
گروه دوم	*۷/۰±۲۲۲/۸	**۵/۱±۷۹/۲	**۰/۱±۰/۵	*۸/۹±۷۶/۹	*۳/۹±۸۷/۲	*۰/۴±۲/۹
گروه سوم	۶/۶±۱۸۲/۵	۱۱/۲±۷۳/۰	۰/۵	۱۰±۶۴/۴	۲/۸±۶۶/۳	۰/۱۲±۲/۸
گروه چهارم	۱۰/۴±۱۶۷	۱۴/۶±۶۴/۸	۰/۴	۵/۶±۳۷/۸	۴/۲±۴۵/۸	۰/۱±۲/۸
گروه پنجم	۸/۴±۱۵۳/۱	۶/۷±۶۰/۶	۰/۴	۵/۸±۳۴/۳	۳۳/۷±۴۳/۵	۰/۲±۳/۳
گروه ششم	۱/۷±۱۰۵/۵	۵/۴±۴۰/۲	۰/۴	۳/۱±۳۴/۰۴	۵/۸۹±۳۵/۳	۰/۱±۴/۱
گروه هفتم	**۴/۵±۱۰۸/۳	*۵/۹±۶۲/۴	*۰/۳±۰/۴	**۴/۲±۲۶/۳	**۷/۸±۳۸/۶	**۰/۲±۴/۳

داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. موش‌ها به ۷ گروه ۵ تایی دریافت‌کننده آلوسکان و دی متیل فومارات و نیز شاهد دسته‌بندی شدند. از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت. از تست توکی به منظور مقایسه اختلاف بین گروه‌های مختلف استفاده شده و حدود معناداری در سطح آماری ($P < 0.01$) * - ($P < 0.001$) ** تعریف شد.

اثر دی متیل فومارات بر سطح پروتئین کربونیل کلیه

سطح پروتئین کربونیل در گروه کنترل دیابتی (دریافت‌کننده آلوسکان ۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0.001$). سطح پروتئین کربونیل در ۳ گروه دریافت‌کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0.001$). همچنین، سطح پروتئین کربونیل در گروه دریافت‌کننده متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۲ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰ و ۴۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت. این کاهش در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg/day) معنادار نبود.

اثر دی متیل فومارات بر سطح گلوکوتایون احیای کلیه

سطح گلوکوتایون احیاء در گروه کنترل دیابتی (دریافت‌کننده آلوسکان ۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0.001$). سطح گلوکوتایون احیاء در ۳ گروه دریافت‌کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0.001$). همچنین، سطح گلوکوتایون در گروه دریافت‌کننده متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) به شکل معناداری افزایش یافت.

اثر دی متیل فومارات بر سطح مالون دی آلدید در کبد

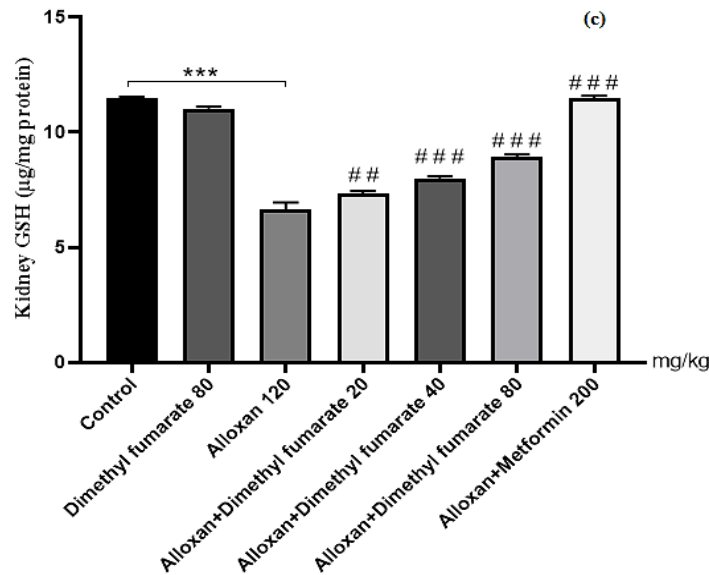
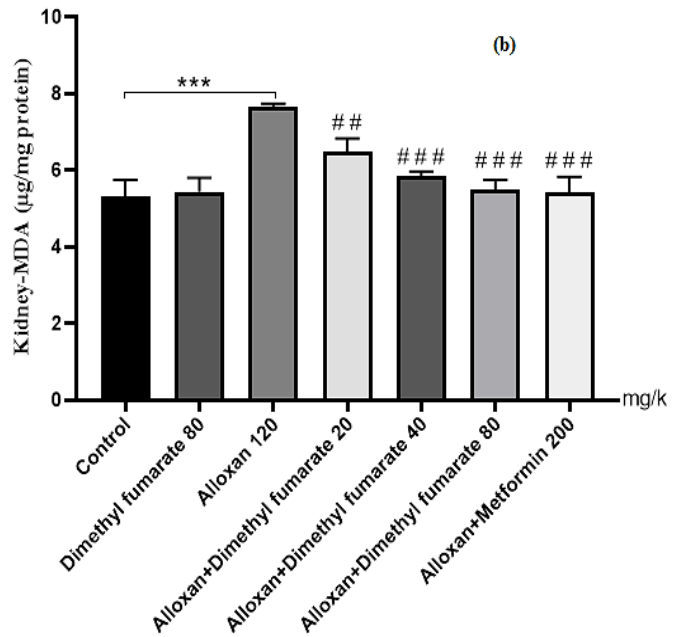
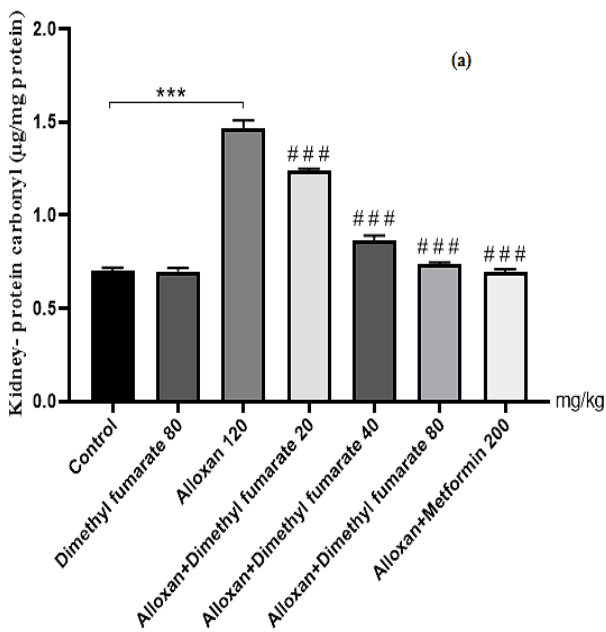
سطح مالون دی آلدید در گروه کنترل دیابتی (دریافت‌کننده آلوسکان ۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0.001$). سطح مالون دی آلدید در ۳ گروه دریافت‌کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0.001$). همچنین، سطح مالون دی آلدید در گروه دریافت‌کننده متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۲ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰ و ۴۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت. این کاهش در مقایسه با گروه دریافت‌کننده دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg/day) معنادار نبود.

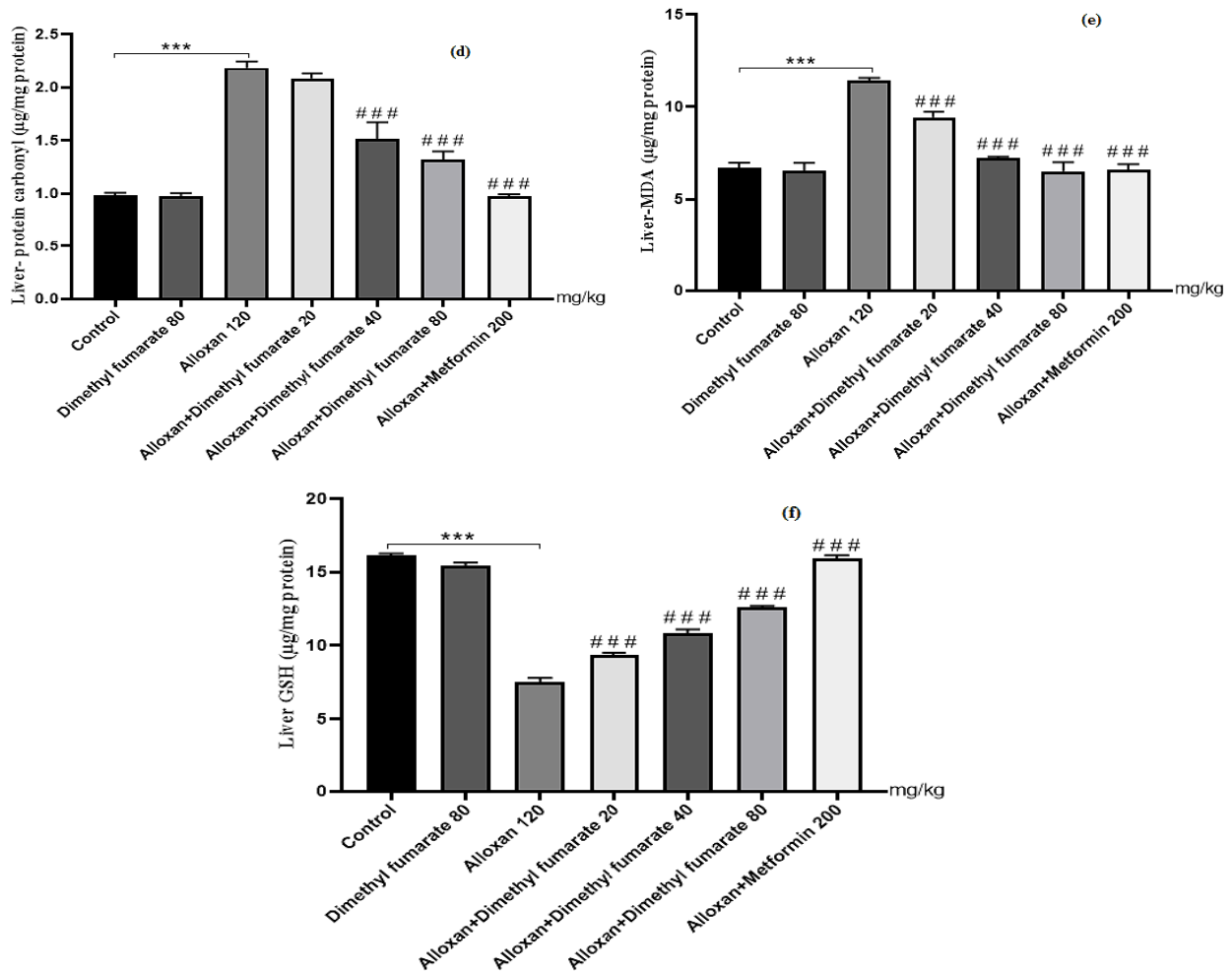
اثر دی متیل فومارات بر سطح پروتئین کربونیل کبد

سطح پروتئین کربونیل در گروه کنترل دیابتی با تزریق آلوسکان (۱۲۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0.001$). سطح پروتئین کربونیل در ۳ گروه دریافت‌کننده دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0.001$). همچنین، سطح پروتئین کربونیل در گروه دریافت‌کننده متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg/day) به شکل معناداری کاهش یافت.

افزایش یافت ($P < 0/001$). همچنین، سطح گلوکاتایون احیا در گروه دریافت کننده متفورمین (200 mg/kg/day) در مقایسه با ۲ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات ($20, 40, 80 \text{ mg/kg/day}$) و ۸۰ به شکل معناداری افزایش یافت.

اثر دی متیل فومارات بر سطح گلوکاتایون احیای کبدی سطح گلوکاتایون احیا در گروه کنترل دیابتی (دریافت کننده آلوکسان 120 mg/kg/day) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). سطح گلوکاتایون احیا در ۳ گروه دریافت کننده دی متیل فومارات ($20, 40, 80 \text{ mg/kg/day}$) در مقایسه با گروه آلوکسان (120 mg/kg/day) به شکل معناداری

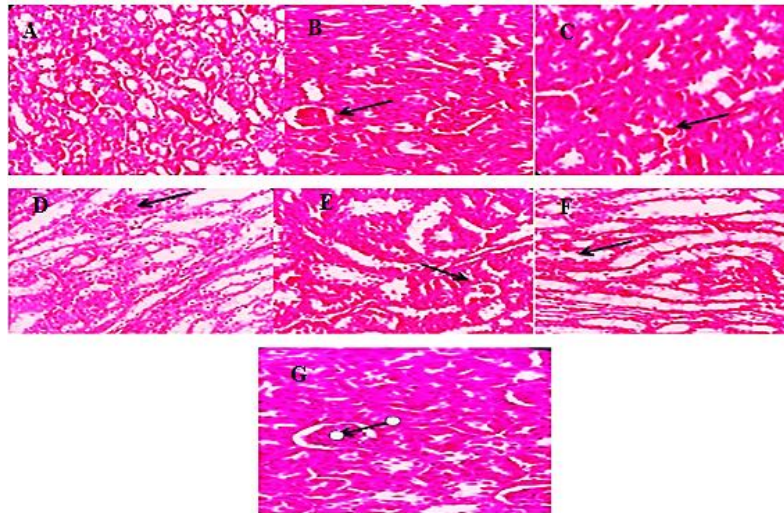




شکل ۱- تغییرات پارامترهای استرس اکسیداتیو در گروه‌های مختلف. اثر دوزهای مختلف دی متیل فومارات بر (a,d) محتوای پروتئین کربونیل، (b, e) مالون دی آلدئید و (c, f) سطح گلوکوتاتیون در بافت کلیه و کبد
 ***: P < 0.001 نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل (منفی) است
 ###: P < 0.001 نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg/day) است

اثر پاتولوژیکی دی متیل فومارات بر بافت کلیه
 در ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت کلیه موش‌های گروه کنترل، تغییرات ساختاری و پاتولوژیکی مشاهده نشد (شکل ۲A). بعد از دریافت آلوکسان، گشادی و دژنراسیون توبول‌ها مشاهده شد (شکل ۲B). با تجویز دی متیل فومارات (۲۰ mg/kg/day) ما شاهد ارتشاح گلومرهای کلیوی بودیم (شکل ۲C). در گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۴۰ mg/kg/day)، هیچ تأثیر پاتولوژیکی معناداری در کلیه موش‌های تحت درمان با دی

متیل فومارات مشاهده نشد و نتایج حاصل مشابه با نتایج پاتولوژیکی گروه شاهد بود (شکل ۲D). در گروه دریافت کننده آلوکسان+دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg)، التهاب و دژنراسیون کمی در بافت کلیه مشاهده شد (شکل ۲E). در گروه دریافت کننده آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day) ما شاهد بروز التهاب، گشادی توبول‌ها و تغییر شکل آنها بودیم (شکل ۲F). با تزریق دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg/day)، تنها بروز التهاب در بافت کلیه مشاهده شد (شکل ۲G).



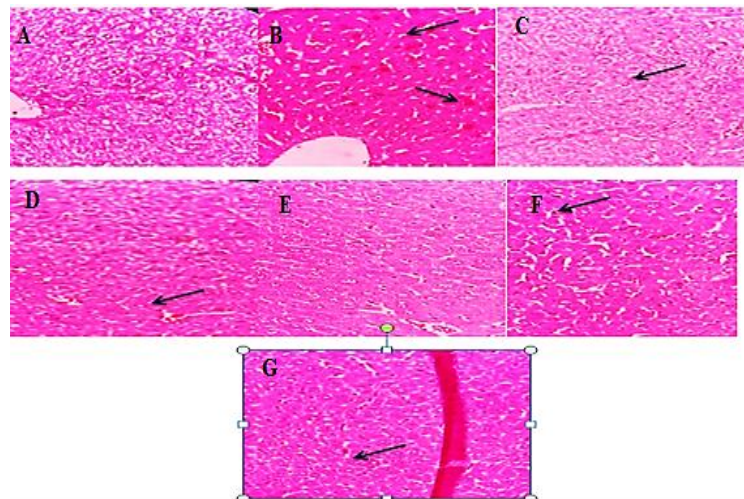
شکل ۲- تصاویر میکروسکوپی مربوط به بافت کلیه موش‌های صحرایی در مواجهه با دی متیل فومارات با رنگ آمیزی

هماتوکسیلین-ئوزین (A) گروه کنترل، (B) گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg)، (C) گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۲۰ mg/kg) (D) گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۴۰ mg/kg)، (E) گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg)، (F) گروه آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg)، (G) گروه دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg). بزرگنمایی (×۴۰).

کبدی بودیم (شکل ۳D). در گروه دریافت کننده آلوکسان+دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg)، گشادی زیادی در توپول‌های بافت کبدی مشاهده شد (شکل ۳E). در گروه دریافت کننده آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg/day)، ما شاهد بروز التهاب و گشادی توپول‌ها بودیم (شکل ۳F). با تزریق دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg/day)، بروز التهاب شدید در اطراف توپول‌های کبدی و گشادشدگی این توپول‌ها به مقدار زیاد مشاهده شد (شکل ۳G).

اثر پاتولوژیکی دی متیل فومارات بر بافت کبد

در ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت کبد موش‌های گروه کنترل، تغییرات ساختاری و پاتولوژیکی مشاهده نشد (شکل ۳A). بعد از دریافت آلوکسان، التهاب در بافت کبد موش‌های دیابتی مشاهده شد (شکل ۳B). با تجویز دی متیل فومارات (۲۰ mg/kg/day) ما شاهد گشادشدگی کمی در توپول‌های کبدی بودیم (شکل ۳C). در گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۴۰ mg/kg/day) هم ما شاهد گشادشدگی کمی در توپول‌های



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپی مربوط به بافت کبد موش‌های صحرایی در مواجهه با دی متیل فومارات با رنگ آمیزی

هماتوکسیلین-ئوزین (A) گروه کنترل، (B) گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg)، (C) گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۲۰ mg/kg) (D) گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۴۰ mg/kg)، (E) گروه آلوکسان+دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg)، (F) گروه آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg)، (G) گروه دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg). بزرگنمایی (×۴۰).

اثرات حفاظتی دی متیل فومارات بر بیان ژن‌های التهابی بافت‌های کبد و کلیه

به منظور ارزیابی سطح التهاب، بیان ژن‌های دخیل در التهاب شامل: اینترلوکین-۶ (IL-6)، فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- α)، NF-KB، Nrf2 و Sirt1 توسط روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان ژن IL-6 در بافت کلیه

مطابق با شکل (۴)، بیان اینترلوکین-۶ در گروه دریافت کننده آلوسکان در مقایسه با گروه شاهد افزایش معناداری داشت ($P < 0/001$). بیان ژن اینترلوکین-۶ در موش‌های تحت تیمار با دی متیل فومارات در ۳ گروه تزریقی با دوز کم، متوسط و زیاد در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). میزان بیان ژن اینترلوکین-۶ در دو گروه تحت تیمار با متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) کاهش معناداری یافت ($P < 0/001$).

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان TNF- α در بافت کلیه

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن TNF- α در گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در ۳ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلفی از دی متیل فومارات در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت. بیان ژن TNF- α در ۲ گروه آلوسکان + متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) به طور معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$).

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان NF-KB در بافت کلیه

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن NF-KB در گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در ۳ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلفی از دی متیل فومارات در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). بیان ژن NF-KB در ۲ گروه آلوسکان + متفورمین

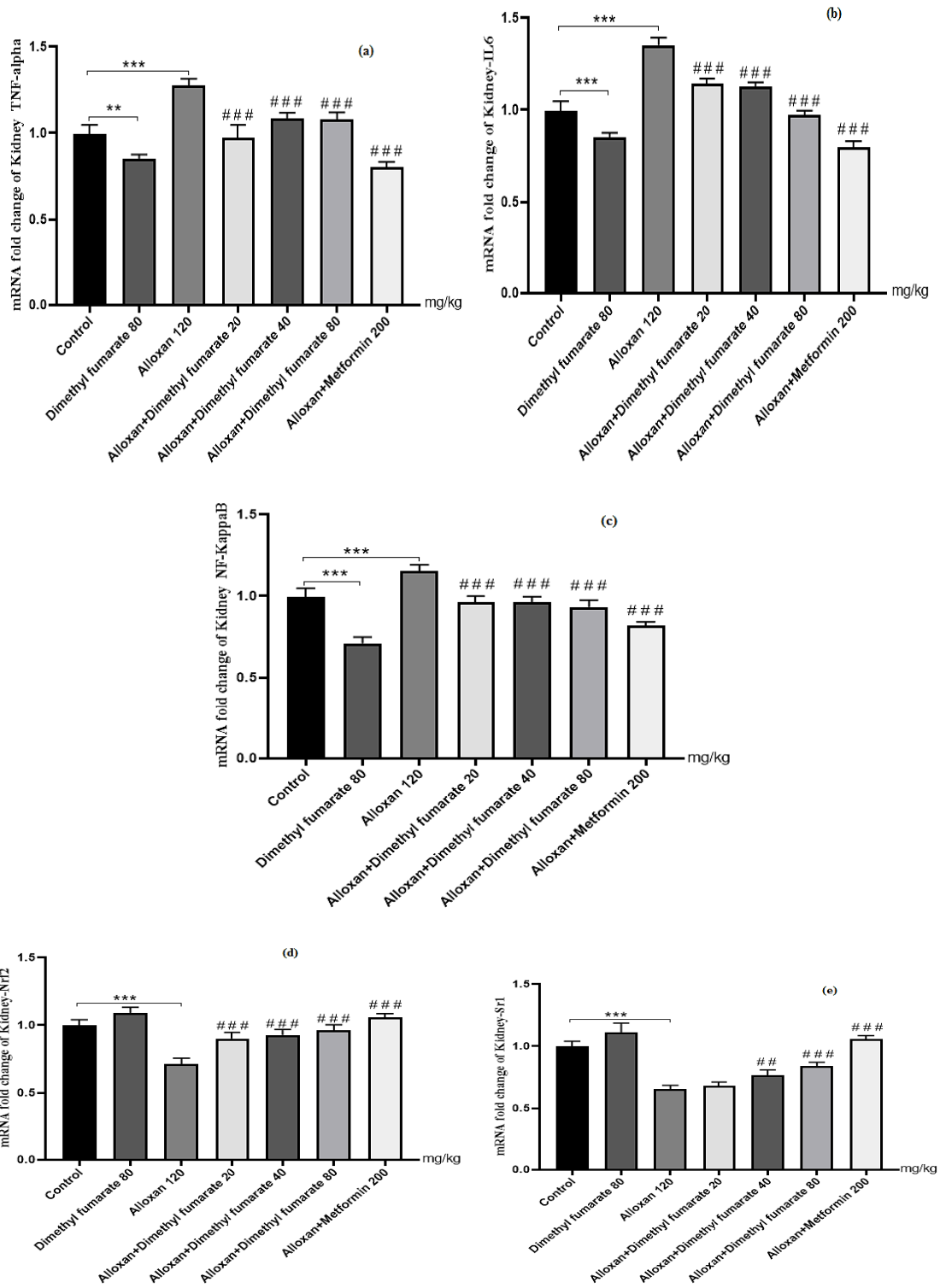
(۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) به طور معناداری کاهش یافت.

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان Nrf2 در بافت کلیه

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن Nrf2 در گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در ۳ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلفی از دی متیل فومارات در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). بیان ژن Nrf2 در ۲ گروه آلوسکان + متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) به طور معناداری افزایش یافت.

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان Sirt-1 در بافت کلیه

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن Sirt-1 در گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در گروه تحت تیمار با آلوسکان + دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با گروه آلوسکان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). بیان ژن Sirt-1 در ۲ گروه آلوسکان + متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) به طور معناداری افزایش یافت.



شکل ۴- تغییرات در بیان ژن های التهابی (a) (IL-6)، (b) (TNF-α)، (c) (NF-KB)، (d) (Nrf2) و (e) Sirt-1 در بافت کلیه ناشی از مواجهه با دی متیل فومارات در دوزهای مختلف

***: (P < ۰/۰۰۱) نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل (منفی) است.

###: (P < ۰/۰۰۱) نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg/day) است.

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان IL-6 در بافت کبد

مطابق با شکل ۵، بیان اینترلوکین-۶ در گروه دریافت کننده آلوکسان در مقایسه با گروه شاهد افزایش معناداری داشت ($P < 0/001$). بیان ژن اینترلوکین-۶ در موش‌های تحت تیمار با دی متیل فومارات در ۲ گروه (۲۰ و ۴۰ mg/kg) در مقایسه با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). میزان بیان اینترلوکین-۶ در دو گروه تحت تیمار با متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) کاهش معناداری یافت ($P < 0/001$).

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان TNF- α در بافت کبد

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن TNF- α در گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در ۳ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلفی از دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) در مقایسه با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری کاهش داشت ($P < 0/001$). بیان ژن TNF- α در ۲ گروه آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) به طور معناداری کاهش داشت ($P < 0/001$).

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان NF-KB در بافت کبد

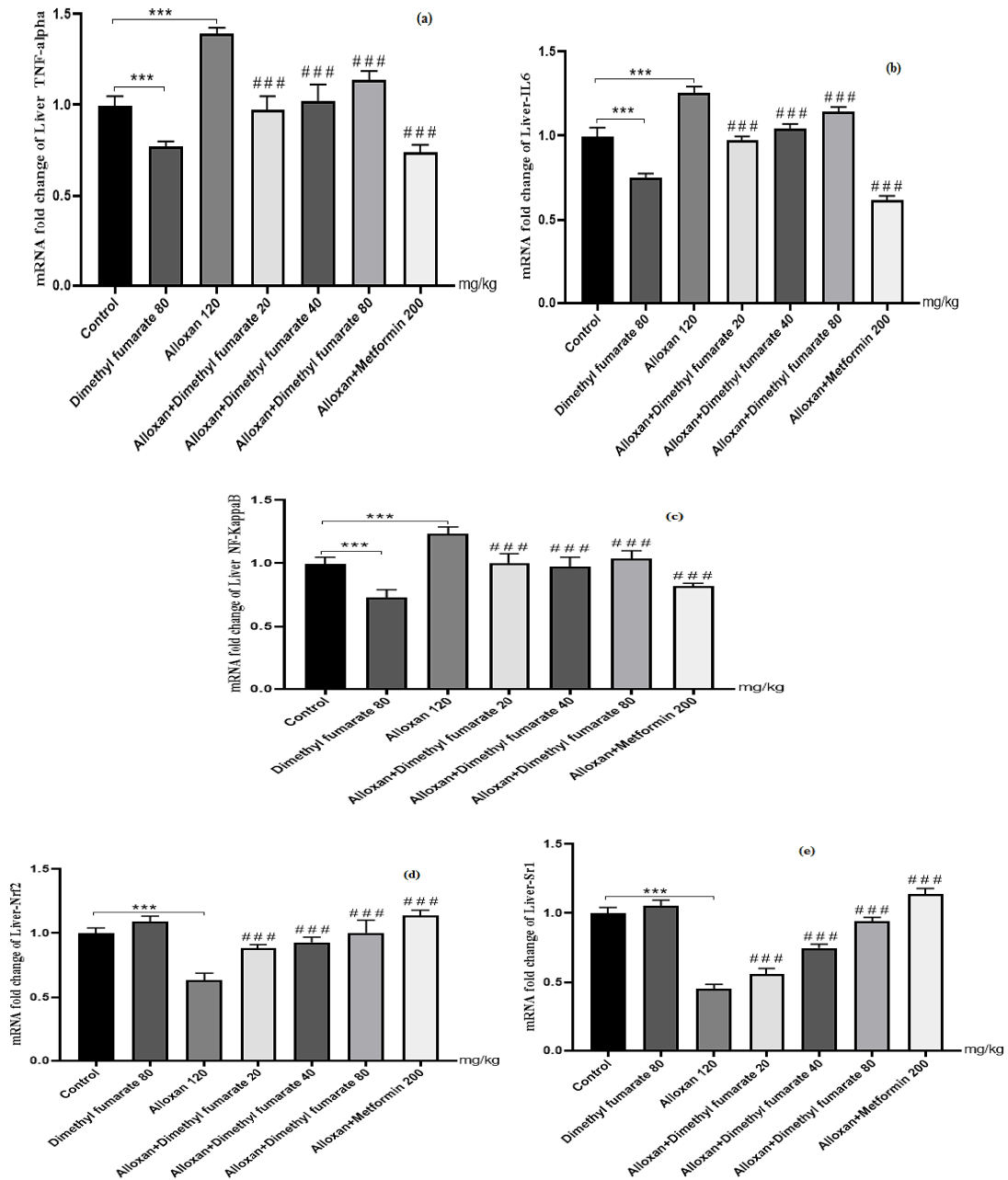
نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن NF-KB در گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در ۳ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلفی از دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) در مقایسه با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). بیان ژن NF-KB در ۲ گروه آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) به طور معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$).

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان Nrf2 در بافت کبد

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن Nrf2 در گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در ۳ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلفی از دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) در مقایسه با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری افزایش یافت. بیان ژن Nrf2 در ۲ گروه آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۲ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰ و ۴۰ mg/kg) به طور معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$).

تأثیر دی متیل فومارات بر بیان Sirt-1 در بافت کبد

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن Sirt-1 در گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0/001$). بیان این ژن در گروه تحت تیمار با آلوکسان+دی متیل فومارات (۴۰ و ۸۰ mg/kg) در مقایسه با گروه آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$). بیان ژن Sirt-1 در ۲ گروه آلوکسان+متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و دی متیل فومارات (۸۰ mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰ mg/kg) به طور معناداری افزایش یافت ($P < 0/001$).



شکل ۵- تغییرات در بیان ژن‌های التهابی (a) (IL-6)، (b) (TNF- α)، (c) (NF- κ B)، (d) (Nrf2) و (e) Sirt-1 در بافت کبد ناشی از مواجهه با دی متیل

فومارات در دوزهای مختلف

*** نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل (منفی) است. ($P < 0/001$)

نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه آلوکسان (120 mg/kg/day) است. ($P < 0/001$)

حفاظتی دی متیل فومارات موجب کاهش شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد، بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی خون و استرس اکسیداتیو و کاهش بیان فاکتورهای التهابی و تاحدی صدمات پاتولوژیکی در بافت‌های کبد و کلیه شد. کبد و کلیه، دو عضو بسیار تأثیرپذیر در طی ابتلا به دیابت و عوارض

بحث

در این مطالعه، تجویز آلوکسان باعث تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی خون، استرس اکسیداتیو، التهاب، ایجاد صدمات هیستوپاتولوژی در هر دو بافت کبد و کلیه گردید. ترکیب

جانبی ناشی از آن هستند. کبد نقش مهمی در حفظ سطوح طبیعی گلوکز خون دارد. در واقع، تخریب کبدی ناشی از مقاومت به انسولین ممکن است به توسعه دیابت نوع دوم کمک شایانی کند. به این ترتیب دیابت و اختلال در متابولیسم چربی کبدی می‌تواند منجر به مقاومت به انسولین شود که باعث تشدید عوارض دیابت، افزایش رسوب چربی کبد و در نهایت منجر به آسیب کبدی و افزایش آنزیم‌های آن می‌شود. یکی از شایع‌ترین عوارض بلندمدت دیابت، آسیب کلیوی است. این بیماری که تحت عنوان نفروپاتی دیابتی یا بیماری کلیوی دیابتی هم شناخته می‌شود، نتیجه ناهنجاری‌های عروقی ناشی از دیابت است و خطر مرگومیر را افزایش می‌دهد. به‌علاوه، دیابت عامل اصلی خطر ابتلا به بیماری کلیوی مرحله نهایی است که پیشرفته‌ترین مرحله آسیب و نقض در عملکرد کلیه محسوب می‌گردد. استرس اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی می‌تواند منجر به تشدید هیپرگلیسمی و افزایش ریسک ابتلا به عوارض دیابت شود [۱]. در همین راستا، فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین-۶ از مهم‌ترین آدیپوکین‌های پیش‌التهابی هستند که بیان آنها در بافت چربی و همچنین سطوح خونی آنها در بیماری‌های متابولیکی مختلف از جمله چاقی، دیابت و مقاومت به انسولین در انسان و جوندگان افزایش می‌یابد [۱۱]. باتوجه به گستردگی و عدم انسجام پژوهش‌ها در این حوزه، ما در این مطالعه بر آن شدیم که اثر دی متیل فومارات را بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون، استرس اکسیداتیو، هیستوپاتولوژیک و بیان ژن‌های التهابی در دو بافت کبد و کلیه در مدل موش‌های دیابتی ناشی از تزریق آلوکسان مورد ارزیابی قرار دهیم.

مطالعات مختلف نشان داده که تجویز دی متیل فومارات می‌تواند منجر به بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی خون و استرس اکسیداتیو بشود [۵، ۶، ۱۲]. در یک مطالعه، Lone و همکاران (۲۰۲۰) به ارزیابی پتانسیل محافظت دی متیل فومارات در نفروپاتی دیابتی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین در موش صحرایی ویستار پرداختند. مدل موش نفروپاتی دیابتی با تزریق داخل صفاقی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین در موش‌های صحرایی ویستار القا شد. حیوانات دیابتی با سه دوز از دی متیل فومارات (۲۰، ۴۰ و ۸۰) در طی یک دوره ۳ ماهه تحت درمان قرار

گرفتند. آزمون‌های اختصاصی به‌منظور ارزیابی شاخص‌های مؤثر بر نفروپاتی دیابتی شامل استرس اکسیداتیو، تعیین پروفایل لیپیدی و تغییرات هیستوپاتولوژیکی بر روی این موش‌ها انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که تجویز دی متیل فومارات منجر به مهار روند رو به رشد شاخص‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو در موش‌ها شد. این مطالعه نشان داد که اثرات ضددیابتی و کاهنده سطح لیپیدی دی متیل فومارات در طی ابتلا به نفروپاتی دیابتی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین در موش‌ها به شکل معناداری افزایش یافت. سطح گلوکز خون با تزریق دی متیل فومارات کاهش یافت. سطح تری‌گلیسیرید کلسترول هم با افزایش اوره، سرم و همچنین اثر آنتی‌اکسیدانی دی متیل فومارات بر کلیه تنظیم شد [۵]. نتایج این مطالعه در دو بخش ارزیابی تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو مشابه با نتایج حاصل از مطالعات ما بود.

دی متیل فومارات و متابولیت فعال آن، مونومتیل فومارات منجر به فعال شدن مسیر Nrf2 مؤثر بر پاسخ سلولی نسبت به استرس اکسیداتیو می‌شود. سازکار اثر درمانی دی متیل فومارات در مولتیپل اسکروزیس دقیقاً مشخص نیست. اما، به‌نظر می‌رسد که این اثر به‌صورت یک واکنش ضدالتهابی و محافظ سلولی و از طریق فعال‌سازی مسیر Nrf2 انجام شود. همچنین مشخص شد که دی متیل فومارات تولید نیتریک اکساید سنتاز و سیتوکین‌های پیش‌التهابی $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ و $IL-6$ و تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی با واسطه NF-kB را در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان کاهش می‌دهد. در نهایت، دی متیل فومارات بر بقای سلول‌های ایمنی تأثیر گذاشته و این اثر احتمالاً بر بقای سلول مؤثر بر بروز لنفوپنی مرتبط است [۱۳].

در یک بررسی، Amin و همکاران (۲۰۲۰) به ارزیابی سازکارهای بالقوه اثرات حفاظتی عروقی دی متیل فومارات در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداختند. تزریق دی متیل فومارات در این مطالعه باعث افت کم قند خون و کاهش محدود سطح سرمی تری‌گلیسیریدها و محصولات نهایی فرآیند گلايک شدن پیشرفته در موش‌های دیابتی شد [۶]. اُفت ناچیز قند خون (در حدود ۳۴/۶ درصد) در مقایسه با مطالعه ما می‌تواند ناشی از تفاوت در دوز دی متیل فومارات مورد استفاده در این دو مطالعه باشد. این یافته‌ها

فومارات توانست منجر به کاهش بیان ژن‌های التهابی و تعدیل مسیر بیان دو ژن سیرتوئین-۱ و Nrf2 در دو بافت کلیه و کبد موش‌های دیابتی شود. احتمالاً، اثر بهبوددهندگی دی متیل فومارات را می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن مرتبط دانست که با کاهش رادیکال‌های آزاد و بیان فاکتورهای التهابی موجب بهبود پارامترهای بیوشیمیایی خون و کاهش صدمات پاتولوژیک در بافت‌های کبد و کلیه می‌شود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت مصرف ترکیبات با خاصیت بارز آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی از جمله دی متیل فومارات می‌تواند در شرایط بروز آسیب‌های اکسیداتیو و التهابی ناشی از دیابت به تنهایی یا به شکل ترکیبی مؤثر و کارآمد عمل نماید.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل رسالهٔ پژوهشی خانم پریسا صابری حسن آبادی با کد اخلاقی مصوب به شماره ۹۸۱۲۱۰۷۰۰۱ از دانشگاه علوم پزشکی مازندران است. بنابراین، نویسنده مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان واحدهای دخیل در انجام این پروژه اعلام می‌دارد.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار دارند که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

همچنین ممکن است نشان دهد که تأثیرات حفاظتی دی متیل فومارات در موش‌های دیابتی صرفاً از طریق کنترل قند خون دیابتی ممکن نیست.

ما در این مطالعه، به منظور بررسی نقش التهاب و مسیر NF-KB در فرآیند بروز آسیب بافتی، بیان ژن‌های α -TNF، IL-6 و NF-KB را با روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار دادیم و مشاهده کردیم بیان ژن‌های مذکور در گروه دریافت‌کننده آلوسکان نسبت به گروه تحت تیمار با دی متیل فومارات به‌طور معناداری افزایش یافت. این اثرات احتمالاً به‌واسطهٔ اثر رادیکال‌های آزاد در القای تولید α -TNF، IL-6 به‌عنوان دو مدیاتور اصلی فعال‌کنندهٔ NF-KB بود. در ضمن در این مطالعه، سطوح بیان دو ژن Sirt-1 و Nrf2 در دو بافت کبد و کلیه در گروه دریافت‌کنندهٔ آلوسکان به شکل معناداری کاهش یافت که می‌تواند متأثر از تشدید فعالیت مسیر NF-KB در موش‌های دیابتی قلمداد شود. این نتایج با یافته‌های قبلی مطابقت داشت که افزایش فعالیت NF-KB و القای عوامل التهابی ناشی از تزریق آلوسکان و استریتوزوسین در برخی بافت‌ها را گزارش می‌کرد [۶].

نتیجه‌گیری

تجویز دی متیل فومارات موجب بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی خون، استرس اکسیداتیو و هیستوپاتولوژی در مقایسه با گروه دیابتی شد. از سوی دیگر، دریافت دی متیل

مآخذ

- Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Diabetes mellitus and renal failure: Prevention and management. *Journal of research in medical sciences: The official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2015; 20(11): 1112.
- Crowley MJ, Diamantidis CJ, McDuffie JR, Cameron CB, Stanifer JW, Mock CK, Wang X, Tang S, Nagi A, Kosinski AS, Williams Jr JW. Clinical outcomes of metformin use in populations with chronic kidney disease, congestive heart failure, or chronic liver disease: a systematic review. *Annals of internal medicine*. 2017; 166(3): 191-200.
- Musso G, Gambino R, Tabibian JH, Ekstedt M, Kechagias S, Hamaguchi M, Hulcrantz R, Hagström H, Yoon SK, Charatcharoenwithaya P, George J. Association of non-alcoholic fatty liver disease with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*. 2014; 11(7): e1001680.
- Dwivedi DK, Jena G.B. Dimethyl fumarate-mediated Nrf2/ARE pathway activation and glibenclamide-mediated NLRP3 inflammasome cascade inhibition alleviate type II diabetes-associated fatty liver in rats by mitigating oxidative stress and inflammation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2023; e23357.
- Lone A, Behl T, Kumar A, Makkar R, Nijhawan P, Redhu S, Sharma H, Jaglan D, Goyal A. Renoprotective potential of dimethyl fumarate in streptozotocin induced diabetic nephropathy in Wistar rats. *Obesity Medicine*. 2020;18:100237.
- Amin FM, Abdelaziz RR, Hamed MF, Nader MA, Shehatou GS. Dimethyl fumarate ameliorates diabetes-associated vascular complications through

- ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway. *Life Sciences*. 2020; 256:117887.
7. Mostafavinia A, Amini A, Ghorishi SK, Pouriran R, Bayat M. The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type I diabetes mellitus and mortality rate in rats. *Laboratory animal research*. 2016; 32: 160-165.
 8. Kourakis S, Timpani CA, de Haan JB, Gueven N, Fischer D, Rybalka E. Dimethyl fumarate and its esters: a drug with broad clinical utility? *Pharmaceuticals*. 2020;13(10):306.
 9. Houghton JP, Smoller BR, Leonard N, Stevenson MR, Dornan T. Diagnostic performance on briefly presented digital pathology images. *The Journal of Pathology Informatics*. 2015;6(1):56.
 10. Pickering RJ, Rosado CJ, Sharma A, Buksh S, Tate M, de Haan JB. Recent novel approaches to limit oxidative stress and inflammation in diabetic complications. *Clinical & Translational Immunology*. 2018;7(4):e1016.
 11. Ebrahimnejad, P., Ghazvini, H., Hasanjani, P., Saberi-Hasanabadi, P., Akhtari, J. and Mohammadi, H., 2024. The Synergistic Effect of Curcumin and Piperine Nanoparticles on Methamphetamine-induced Neurotoxicity, Oxidative Stress, and Memory Impairments in Mice Brain. *Letters in Drug Design & Discovery*, 21(15), pp.3149-3160.
 12. Hu X, Rajesh M, Zhang J, Zhou S, Wang S, Sun J, Tan Y, Zheng Y, Cai L. Protection by dimethyl fumarate against diabetic cardiomyopathy in type 1 diabetic mice likely via activation of nuclear factor erythroid-2 related factor 2. *Toxicology letters*. 2018; 287:131-141.
 13. Dwivedi DK, Jena GB. Dimethyl fumarate-mediated Nrf2/ARE pathway activation and glibenclamide-mediated NLRP3 inflammasome cascade inhibition alleviate type II diabetes-associated fatty liver in rats by mitigating oxidative stress and inflammation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2023; p.e23357.

The Protective Effects of Dimethyl Fumarate on Hepato-Renal Toxicity in Alloxan-Induced Diabetic Mice Through Oxidative Stress and Inflammation Signaling Pathways

Parisa Saberi-Hasanabadi^{1,2*}

1. Faculty of pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

2. Student Research Committee, Mazandaran University of Medical sciences, sari, Iran

ABSTRACT

Background: Despite advances in diabetes-related treatments, the effects of the disease have not yet been adequately reversed or prevented in patients. Therefore, there is an urgent need to develop more effective medication-assisted treatments in this field.

Methods: In this study, type 1 diabetes mice models was established using multiple low-dose alloxan, and the diabetic mice were treated with three doses of dimethyl fumarate (DMF) i.e low, medium, and high viz. 20, 40 and 80 mg/kg, respectively for a period of 21 days. Then, specific test were done to evaluate blood biochemical parameters, oxidative stress markers, inflammatory genes expression, and histopathological changes in the mice kidney and liver.

Results: The obtained results showed remarkably improved anti-diabetic, hepato-renal-protective, and oxidative stress indexes of DMF in alloxan-induced diabetic mice ($P < 0.001$). Treated mice with DMF demonstrated a noteworthy decrease in blood glucose levels when compared with diabetic group ($P < 0.001$). Diabetic liver and kidney tissues showed marked dilation of bile ducts, tubules, infiltration, and inflammation. On the contrary, the histological features of the treated mice with DMF improve as shown by normal size of glomerular capillaries along with decrease in less dilatation of ducts in comparison with diabetic mice. The real-time quantitative PCR results indicated that DMF injection decreased the alloxan-induced increase of significant elevations in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines levels in both kidney and liver tissues. Meanwhile, mice treated with DMF showed an increase in Sirt1 and Nrf2 expression in comparison to diabetic group.

Conclusion: In conclusion, it can be concluded that DMF treatment provides hepato-renal protective effects on alloxan-induced diabetic mice model by attenuating ROS inflammatory pathways.

Keywords: Diabetes, Alloxan, Dimethyl fumarate, Oxidative stress, Anti-inflammatory responses, Hepato-renal-protective effects.

*Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Khazar Abad Road (Km-17th), Sari, Iran. ; P.O. Box: 48471-93696 ; Tel: +98 11-33543762, Email: dr.parisasaberi@gmail.com.

