

اثرات هم‌افزایی والپروات سدیم و متفورمین در محافظت کلیوی موش‌های مبتلا به نفروپاتی دیابتی از مسیر کاهش بیان ژن‌های التهابی و افزایش بیان Sirt-1 و Bcl-2

عنوان مکرر: ارزیابی هم‌افزایی اثرات حفاظت کلیوی والپروات سدیم و متفورمین بر موش‌های مبتلا به نفروپاتی دیابتی

دکتر پریسا صابری حسن آبادی^{۱*}

۱. دکتری تخصصی سم‌شناسی داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۲. کمیته تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

<https://orcid.org/0000-0002-9563-2099>

مؤلف مسئول: دکتر پریسا صابری حسن آبادی. ساری، کیلومتر ۱۷ جاده فرح‌آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم،

دانشکده داروسازی dr.parisasaberi@gmail.com

چکیده

مقدمه: دیابت، شایع‌ترین بیماری متابولیک ناشی از کمبود نسبی ترشح یا عملکرد انسولین است. این مطالعه، با هدف ارزیابی اثرات هم‌افزایی بازدارنده والپروات سدیم (VPS) و متفورمین (MET) بر نفروپاتی دیابتی ناشی از آلوکسان و شناخت مکانیسم اثر آنها از مسیر بیان ژن‌های التهابی، Sirt-1 و Bcl-2 بود.

روش‌ها: موش‌های ماده از نژاد (C57BL/6) با استفاده از تزریق درون-صفاقی یک دوز از آلوکسان (۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به دیابت مبتلا شدند. موش‌های دیابتی با سه دوز از والپروات سدیم (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و یک دوز از متفورمین (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) برای یک دوره ۲۸ روزه تحت درمان قرار گرفتند. بیان ژن‌های التهابی و تغییرات بافتی کلیه موش‌ها ارزیابی شد.

یافته‌ها: افزایش قند خون ناشی از القای دیابت توسط آلوکسان به دنبال یک دوره ۲۸ روزه از تجویز والپروات سدیم به صورت معناداری کاهش یافت ($P < 0.05$). درمان ترکیبی والپروات سدیم با متفورمین موجب کاهش معنادار بیان ژن‌های التهابی در بافت کلیه موش‌های دیابتی شد. افزایش معناداری در بیان Sirt-1 و Bcl2 در موش‌های دیابتی دریافت‌کننده والپروات سدیم و متفورمین نسبت به گروه دیابتی مشاهده شد. درمان موش‌های دیابتی با والپروات سدیم و متفورمین از تغییرات سوء هیستوپاتولوژیکی ناشی از نفروپاتی کلیوی جلوگیری کرد که با اندازه‌گیری طبیعی مویرگ‌های گلومرولی همراه با کاهش اتساع مجاری ادراری در مقایسه با موش‌های دیابتی همراه شد.

نتیجه‌گیری: تجویز همزمان والپروات سدیم و متفورمین می‌تواند از نفروپاتی دیابتی ناشی از آلوکسان از طریق تضعیف مسیرها و کاهش بیان ژن‌های التهابی و احتمالاً با تشدید سرکوب استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز جلوگیری کند.

واژگان کلیدی: دیابت، آلوکسان، والپروات سدیم، متفورمین، پاسخ‌های ضدالتهابی، اثرات حفاظت از بافت کلیوی.

مقدمه

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 برسند [۱]. عوارض دیابت به دو گروه کوتاه-مدت و بلندمدت مثل آسیب‌های قلبی، کلیوی و کبدی تقسیم می‌شوند. نارسایی‌های 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 نروپاتی 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 به عنوان مهم‌ترین هدف در این سمیت مطرح شده که در نهایت منجر به آسیب بافتی کلیه و کبد می‌شود. تولید گونه‌های فعال اکسیژن از مسیر زنجیره تنفسی در سلول‌ها و بیان ژن-های التهابی و شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن در میتوکندری، یکی از چند علل اصلی آسیب‌های بافتی ناشی از قند خون بالا است. همچنین، عدم وجود دفاع مناسب آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به فعال‌شدن مسیر پیام‌رسانی وابسته به استرس اکسیداتیو بشود [۲ و ۳]. به علت 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 مورداستفاده جهت القای دیابت محسوب می‌شوند [۴]. والپروات سدیم دارای فعالیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است و از طریق مشارکت هیستون داستیلازها در پاتوژنز آسیب کلیوی دیابتی و فیروز منجر به کاهش آسیب اندام‌های درگیر در شرایط پاتولوژیک مختلف می‌شود. این ترکیب شیمیایی با مهار هیستون داستیلاز، موجب تغییر در ساختار هیستون‌های کروماتین شده و در نتیجه بر بیان ژن‌ها هم اثر می‌گذارد. نشان داده شده که مهارگرهای هیستون داستیلاز می‌توانند با افزایش رگ‌زایی، آسیب‌های ناشی از اختلال عروقی را جبران کنند. همچنین نشان داده شده که والپروات با مهار فاکتورهای آپوپتوزی سبب محافظت بافت نرونی در برابر آسیب‌ها می‌شود [۴]. در همین راستا، دو بررسی مجزا نشان دادند که والپروات در مدل دیابتی سبب افزایش ترمیم سلول‌های بتای پانکراس و جبران قند خون افزایش یافته می‌شود [۵، ۶]. هرچند مطالعات در حوزه نروپاتی دیابتی و اثر ترکیبی تجویز همزمان والپروات سدیم و متفورمین بر بیان ژن‌ها محدودتر است. در یک مطالعه، الشربینی و همکاران (۲۰۱۹)، اقدام به ارزیابی اثر مهارکنندگی والپروات سدیم بر نوع درد در موش‌های دیابتی تحت سرکوب هیستون داستیلاز (۱) نخاعی و واسطه‌های التهابی نمودند. در مجموع، داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که کاهش درد و فعالیت ضدالتهابی والپروات سدیم حداقل تا حدودی از طریق مهار هیستون داستیلاز (۱) ستون فقرات و واکنش‌پذیری گلیا انجام می‌شود [۷].

از آنجایی که نروپاتی دیابتی بصورت یک اپیدمی خاموش در حال گسترش است، می‌توان با مطالعات دقیق بر روی مهارکننده‌های هیستون داستیلاز، شاهره جدیدی جهت مقابله با این سندروم در بیماران مبتلا به دیابت فراروی داروسازان قرار داد. این مطالعه، به بررسی تأثیر همزمان متفورمین و والپروات سدیم بر نروپاتی دیابتی در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان و ارزیابی بیان ژن‌های التهابی، Sirt-1 و Bcl-2 می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

مواد

از آلوكسان جهت القای دیابت در موش و متفورمین به عنوان داروی کنترل استفاده شد. آلوكسان از شرکت رویش دارو خریداری شد. والپروات سدیم و متفورمین از شرکت داروسازی راموفارمین (تهران، ایران) خریداری شد. کیت‌های تخمین سطوح گلوکز خون از شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی هم از تأمین‌کنندگان تجاری استاندارد به دست آمد. مواد شیمیایی مورد استفاده برای انجام این تحقیق دارای کیفیت آزمایشگاهی مطلوبی بوده و محلول‌های شیمیایی در هر بار قبل از استفاده به صورت 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 ۱ g ۲۵-۳۰±) تحت شرایط نگهداری استاندارد در اتاقی با دوره ۱۲ ساعته تاریکی/روشنایی، دمای $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. تمام مراحل نگهداری و انجام آزمایشات بر طبق پروتکل‌های کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد (کد اخلاق: IR.MAZUMS.4.REC.1397.1396).

موش‌ها به ۷ گروه ۱۰ تایی تقسیم و گروه‌های دریافت‌کننده آلوكسان، والپروات سدیم و متفورمین به صورت زیر دسته‌بندی شدند:

گروه ۱: کنترل منفی (نرمال سالین)، تزریق داخل صفاقی، به مدت ۴ هفته روزی یکبار.

گروه ۲: دیابتی، آلوكسان، تزریق داخل صفاقی (۱۲۰ mg/kg).

گروه ۳: آلوكسان + والپروات سدیم (۱۰ mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۴ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۴: آلوكسان + والپروات سدیم (۲۰ mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۴ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۵: آلوكسان + والپروات سدیم (۴۰ mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۴ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۶: متفورمین (۲۰۰ mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۴ هفته متوالی روزی یکبار.

گروه ۷: والپروات سدیم (۴۰ mg/kg) + متفورمین (۲۰۰ mg/kg) تزریق داخل صفاقی، به مدت ۴ هفته متوالی روزی یکبار.

در پایان ۲۱ روز، موش‌ها با کتامین/زایلازین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، داخل صفاقی) بیهوش شده و کلیه آنها با لاپاراتومی جدا شدند. ابتدا بافت‌های خارج شده را با بافر سرد مانیتول (مانیتول ۰/۲۵۵ M، ساکاروز ۷۴ mM EDTA ۰/۲) شستشو داده و سپس با قیچی 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 $2000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت (مایع رویی) بدست 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 [۵، ۶].

تزریق آلوكسان و القای دیابت

موش‌ها با تزریق داخل صفاقی آلوكسان 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].

ارزیابی بافت کلیه در موش‌های صحرایی

به منظور ارزیابی میکروسکوپی، نمونه‌های بافتی به ابعاد تقریباً یک سانتی‌مترمربع از کلیه 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 آغستگی)، تهیه بلوک‌های پارافینی و برش‌های ۵ میکرونی (با استفاده از میکروتوم دوار و ۱۰ برش از هر نمونه با ضخامت مشابه) و به روش هماتوکسیلین-ائوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری (با درشت‌نمایی $\times 400$) متصل به مانیتور و مجهز به دوربین عکاسی ارزیابی شد [۸]. برای ارزیابی تغییرات بافتی از هر موش سه لام و از هر لام ۱۰ فیلد میکروسکوپی به وسیله میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

سنجش بیان ژن‌ها

پس از بیهوش کردن حیوانات، ۳۰۰ mg از بافت 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 80°C - نگه‌داری شد. 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 $\Delta\Delta\text{CT}$ و در نهایت رسم نمودارها بر حسب $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ جهت محاسبه تغییرات بیان ژن در نمونه‌ها انجام شد. تمامی ژن‌های منتخب در این مطالعه منطبق و مکمل بر مطالعات گذشته بود [۹، ۱۰].

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

Primer	Sequence	
TNF- α	Forward	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
	Reverse	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC
IL-6	Forward	AGACTTCCATCCAGTTGCCT
	Reverse	CATTTCCACGATTTCCCAGAGA'
NF- κB	Forward	AGCCACAGAGATGGAGGAGTTG
	Reverse	GGATGTCAGCACCAGCCTTTAG
Sirt1	Forward	AGCTCCTTGGAGACTGCGAT'
	Reverse	ATGAAGAGGTGTTGGTGGCA

F: Forward primer, R: Reverse primer.

ارزیابی آماری

اطلاعات آماری حاصل از این پژوهش به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. نمودارهای حاصل توسط برنامه پرسم 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

اثرات حفاظتی والپروات سدیم و متفورمین بر بیان ژن‌های التهابی بافت کلیه

به منظور ارزیابی سطح التهاب، بیان ژن‌های دخیل در التهاب شامل: اینترلوکین-۶ (IL-6)، فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- α)، NF-KB و Sirt-1 با روش Real-time PCR مورد سنجش قرار گرفت.

تأثیر والپروات سدیم و متفورمین بر بیان ژن IL-6 در بافت کلیه

مطابق با شکل (۱)، بیان اینترلوکین-۶ در گروه دریافت‌کننده آلوکسان در مقایسه با گروه شاهد افزایش معناداری داشت ($P < 0.001$). بیان ژن اینترلوکین-۶ در موش‌های تحت تیمار با والپروات سدیم و متفورمین در مقایسه با گروه آلوکسان (120 mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0.001$). میزان بیان ژن اینترلوکین-۶ در دو گروه تحت تیمار با متفورمین (200 mg/kg) و دی‌متیل‌فومارات و والپروات سدیم در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با والپروات سدیم به تنهایی (10 mg/kg)، ۲۰ و ۴۰ کاهش بیشتری یافت ($P < 0.001$).

تأثیر والپروات سدیم و متفورمین بر بیان TNF- α در بافت کلیه

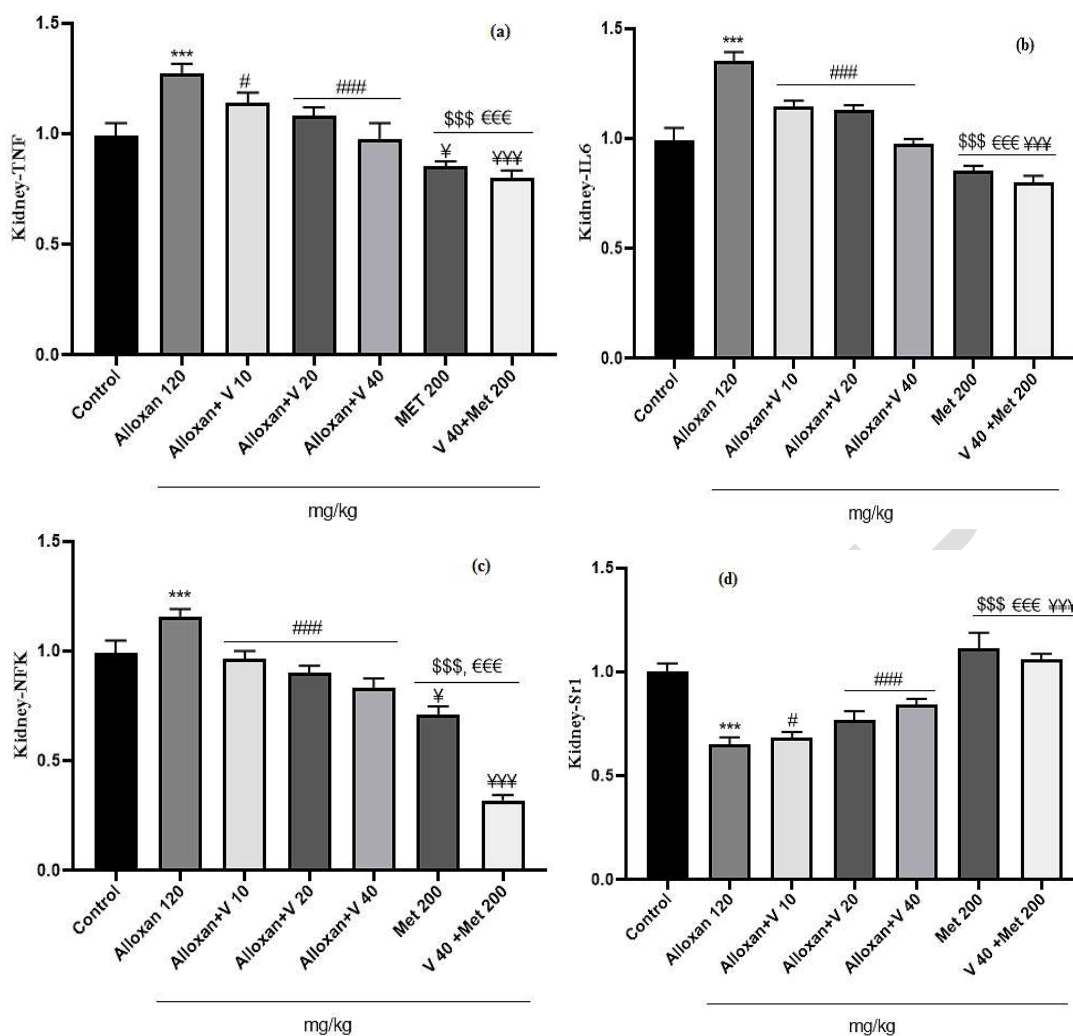
نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن TNF- α در گروه آلوکسان (120 mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0.001$). بیان این ژن در ۳ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلفی از والپروات سدیم و متفورمین در مقایسه با گروه آلوکسان (120 mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت. بیان ژن TNF- α در ۲ گروه والپروات سدیم + متفورمین (200 mg/kg) در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با والپروات سدیم (10 mg/kg)، ۲۰ و ۴۰ کاهش بیشتری یافت ($P < 0.001$).

تأثیر والپروات سدیم و متفورمین بر بیان NF-KB در بافت کلیه

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن NF-KB در گروه آلوکسان (120 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 والپروات سدیم در مقایسه با گروه آلوکسان (120 mg/kg) به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0.001$). بیان ژن NF-KB در گروه والپروات سدیم + متفورمین در مقایسه با ۳ گروه تحت تیمار با والپروات سدیم (10 mg/kg)، ۲۰ و ۴۰ به طور معناداری کاهش یافت.

تأثیر والپروات سدیم و متفورمین بر بیان Sirt-1 در بافت کلیه

نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن Sirt-1 در گروه آلوکسان (120 mg/kg) در مقایسه با گروه کنترل منفی به شکل معناداری کاهش یافت ($P < 0.001$). بیان این ژن در گروه تحت تیمار با متفورمین (200 mg/kg) در مقایسه با گروه آلوکسان (120 mg/kg) به شکل معناداری افزایش یافت ($P < 0.001$). بیان ژن Sirt-1 در گروه والپروات سدیم + متفورمین (200 mg/kg) و ۳ گروه تحت تیمار با والپروات سدیم در مقایسه با گروه دیابتی افزایش یافت.



Data are presented as mean± SD (n=10).
 *** (P< 0.001) vs. control group.
 ### (P< 0.001) vs. diabetic group.
 \$\$\$ (P< 0.001) vs. diabetic group + VPS10.

شکل ۱. اثر متفورمین و والپروات سدیم بر سطوح کلیوی بیان ژن‌های التهابی در موش‌های دیابتی. (a) تأثیر متفورمین + والپروات سدیم بر بیان TNF-α، (b) تأثیر متفورمین + والپروات سدیم بر بیان IL-6، (c) تأثیر متفورمین + والپروات سدیم بر بیان NF-κB، (d) تأثیر متفورمین + والپروات سدیم بر بیان Sirt-1.

***: 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.

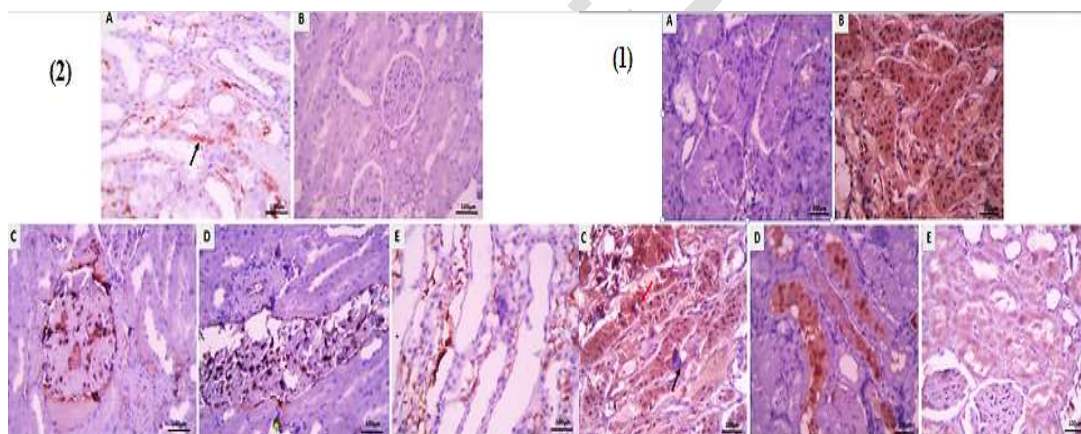
\$\$\$ P< 0.001: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه والپروات سدیم (۱۰ mg/kg/day) است.

€€€ P< 0.001: نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه والپروات سدیم (۲۰ mg/kg/day) است.

¥¥¥ (P< 0.001): نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه والپروات سدیم (۴۰ mg/kg/day) است.

اثر پاتولوژیکی والپروات سدیم بر بافت کلیه

ارزیابی هیستوپاتولوژیکی بافت کلیه با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام شد (شکل ۲). کلیه موش‌های گروه کنترل ساختار طبیعی داشتند (A). با تزریق آلوکسان، اتساع و دژنراسیون خفیف توبول‌ها در موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (B). از سوی دیگر، برش کلیوی موش‌های دیابتی نشان از تافت‌های گلوبومرولی منقبض شده، افزایش فضای بومن و گشادشدن لوله‌های تشنج‌شده پروگزیمال و دیستال با تعداد نسبتاً بالاتر سلول‌های مزانژیال داشت. برش‌های کلیه موش‌های دیابتی پس از درمان با والپروات سدیم به مدت ۲۸ روز متوالی در دوزهای متوسط (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز) نشان داد که ظاهر و اندازه معمول مویرگ‌های گلوبومرولی حفظ شده است. کپسول بومن، لوله‌های پروگزیمال و دیستال نیز از نظر اندازه و ضخامت بهبود یافتند. به علاوه، سلول‌های التهابی موجود در گروه دیابتی با ترکیبی از هر دو تیمار (والپروات سدیم و متفورمین) درمان شدند. ولی، بیشتر توبول‌ها با ساختار طبیعی دست‌نخورده ظاهر شدند (شکل E). در مقایسه با گروه نرمال، آپوپتوز به طور معناداری در گروه نفروپاتی دیابتی افزایش یافت (شکل B). با این حال، در مقایسه با گروه نفروپاتی دیابتی، آپوپتوز در گروه تحت تیمار با والپروات سدیم و متفورمین کاهش یافت (شکل C و D). در مقایسه با گروه کنترل، بیان Bax و کاسپاز-۳ در گروه دچار نفروپاتی دیابتی افزایش یافت. این در حالی است که بیان پروتئین Bcl-2 کاهش یافت. در مقابل، در مقایسه با گروه نفروپاتی دیابتی، بیان Bax و کاسپاز-۳ در گروه والپروات سدیم و متفورمین کاهش و بیان Bcl-2 افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که والپروات سدیم در ترکیب با متفورمین می‌تواند آپوپتوز را در بافت کلیه کاهش دهد.



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپی مربوط به بافت کلیه موش‌های صحرایی در مواجهه با والپروات سدیم و متفورمین با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین. ۱: ژن‌های Bax & Caspase و ۲: Bcl2. A) گروه کنترل، B) گروه دیابتی (۱۲۰ mg/kg)، C) گروه متفورمین (D) گروه والپروات سدیم، E) گروه متفورمین + والپروات سدیم. بزرگنمایی (×۴۰۰).

بحث

در این مطالعه، تجویز آلوکسان باعث تغییر در بیان ژن‌های مؤثر بر التهاب و بروز صدمات هیستوپاتولوژی در بافت کلیه موش‌های دیابتی شد. ترکیب حفاظتی متفورمین و والپروات سدیم موجب کاهش شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد، استرس اکسیداتیو و کاهش بیان فاکتورهای التهابی و صدمات پاتولوژیکی در بافت‌های کلیه شد. کلیه، عضو بسیار تأثیرپذیر در طی ابتلا به دیابت و عوارض جانبی ناشی از آن محسوب 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 مرگ و میر را افزایش می‌دهد. به علاوه، 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 [۱۱]. در همین راستا، فاکتور نکروز توموری آلفا و اینترلوکین-۶ از مهم‌ترین آدیوکین‌های 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 [۱۰]. با توجه به گستردگی و عدم انسجام پژوهش‌ها در این حوزه، ما در این مطالعه بر آن شدیم که اثر همزمان متفورمین و والپروات سدیم را بر شاخص‌های هیستوپاتولوژیک و بیان ژن‌های التهابی در بافت کلیه موش‌های دیابتی ناشی از تزریق آلوکسان مورد ارزیابی قرار دهیم.

مطالعات مختلف نشان داده که تجویز والپروات سدیم می‌تواند منجر به بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی خون و استرس اکسیداتیو در مدل‌های دیابتی شود [۱۲، ۱۳]. در یک مطالعه، اُمتی و همکارانش (۲۰۲۱) اظهار داشتند که متفورمین از طریق تنظیم استرس اکسیداتیو و عملکرد میتوکندری، نفروپاتی مرتبط با کلستاز را کاهش می‌دهد. نقش محافظت‌کننده متفورمین در درجه اول با اثرات آن بر پارامترهای استرس اکسیداتیو و عملکرد میتوکندری مرتبط است [۱۴].

در مطالعه حاضر، آلوکسان باعث افزایش معنادار قند خون و کاهش اندازه جزایر، تغییرات نکروزه در سلول‌های جزایر و متعاقب آن آسیب کلیوی شد که با احتقان شدید گلوامرولی، نکروز لوله‌ای و خونریزی بین لوله‌ای نیز مشخص شد. این نتایج مطابق با مطالعات خان و همکاران در سال (۲۰۱۵) [۱۵] بود که در موش‌های دیابتی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین، توفت‌های گلوامرولی، پرخونی بین لوله‌ای، و تغییرات دژنراتیو در سلول‌های اپیتلیوم پوشش‌دهنده مجراهای کلیوی را گزارش کردند. در این راستا، سیتوکین‌های پیش‌التهابی، $TNF-\alpha$ و واسطه‌های آپوپتوز شناسایی شده از نظر ایمنی-هیستوشیمیایی، Bax و کاسپاز-۳، در کلیه موش‌های دیابتی در نتیجه درمان با ترکیبات ضد دیابت به طور معناداری کاهش یافت. این در حالی است که بیان پروتئین آپوپتوز Bcl-2 افزایش یافت. اثرات مضر آلوکسان بر کلیه ممکن است با افزایش استرس اکسیداتیو و ضعیف شدن سیستم دفاعی آنتی-اکسیدانی بدن مرتبط باشد. گونه‌های فعال اکسیژن، مسیرهای سیگنال‌دهی مختلفی را فعال می‌کنند که در اتیولوژی چندین عارضه دیابتی از جمله نفروپاتی دیابتی نقش دارند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن، دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را کاهش و آسیب اکسیداتیو را افزایش می‌دهند. لیپیدها، DNA و پروتئین‌ها، بیشتر تحت تأثیر رادیکال‌های آزاد اکسیژن قرار می‌گیرند. این اکسیداسیون منجر به تغییراتی در ساختار و عملکرد سلول مانند نکروز سلولی کلیه و جهش در ژن‌های درخیل در کنترل پروتئین‌ها شده که تکثیر سلولی و آپوپتوز را تنظیم می‌کنند [۱۶].

مطالعه حاضر مبتنی بر تجویز روزانه والپروات سدیم و متفورمین به موش‌های تحت درمان با آلوکسان در سه دوز مختلف، یعنی دوز پایین ۱۰، متوسط ۲۰ و بالا ۴۰ (میلی‌گرم بر کیلوگرم) به مدت ۴ هفته متوالی است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که عوامل متعددی از جمله مواد مغذی اضافی و اسیدهای چرب آزاد، گلوکز بالا و شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط دیابتی می‌تواند باعث فعال شدن پروتئین کیناز C، پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن، استرس شبکه آندوپلاسمی با فاکتور رونویسی NF- κ B و شروع مسیرهای طرفدار آپوپتوز شود که منتهی به آپوپتوز و آسیب بافت کلیوی می‌شوند [۱۶، ۱۷].

درمان با متفورمین موجب تحریک فسفوریلاسیون پروتئین کیناز فعال شده با AMP و متعاقباً کاهش بیان سیگنال mTOR در مشکلات حاد کلیوی می‌شود. این امر اتوفازی را افزایش داده و از فیروزه، هیپرتروفی، انتقال اپیتلیال-مزانشیمی و آپوپتوز سلول‌های کلیوی جلوگیری می‌کند. در این راستا، والپروات سدیم همچنین یک مهارکننده آنزیم دی-استیلاسیون هیستون است که سطح استیلاسیون هیستون‌ها را افزایش می‌دهد و رونویسی ژن را ترویج می‌کند [۱۸، ۱۹]. اکنون پیشنهاد شده از این دو دارو برای درمان بیماران کلیوی استفاده شود. با این حال، مکانیسم درمانی درگیر باید روشن شود.

علاوه بر نقش استرس اکسیداتیو در القای نفروپاتی، التهاب و آپوپتوز نیز ممکن است نقش مهمی در اختلال عملکرد کلیه و زوال بافتی ایفا کنند. در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان در مطالعه حاضر، ما شاهد افزایش معنادار بیان سیتوکین‌های پیش‌التهابی، TNF- α و کاسپاز-3 از نظر ایمونوهیستوشیمی و همچنین کاهش نشانگرهای ضد آپوپتوز Bcl-2 و Sirt-1 بودیم. این نتایج منتظر با نتایج حاصل از مطالعه قبلی محققانی چون پارادپ و سیرینیواسان بود [20]. آنها بیان کردند که با افزایش همزمان محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته، NF-kB، سیکلواکسیژناز-2، سیتوکین‌ها و Bcl2 در موش‌های دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین، ما شاهد افزایش خطر نفروپاتی دیابتی خواهیم بود. در مطالعه حاضر، افزایش TNF- α ، NF-kB و IL-6 در کلیه موش‌های دیابتی و کاهش بیان آنها تحت درمان با متفورمین و والپروات سدیم حاکی از اثر ضدالتهابی این داروها است. اثر سینرژیستی همزمان متفورمین و والپروات سدیم در مقایسه با گروه‌های تحت درمان با هریک از این ترکیبات دارویی به تنهایی معنادار بود.

دونت-کورآ و همکارانش در سال (2020)، بر پاتوژنز مولکول‌های پیش‌التهابی و مکانیسم‌های مربوط به توسعه و پیشرفت نفروپاتی دیابتی تمرکز کردند و در مورد کاربرد بالقوه استراتژی‌های جدید مبتنی بر عواملی که التهاب را هدف قرار می‌دهند، بحث کردند. آنها اظهار داشتند که رویکردهای درمانی آتی با قابلیت تعدیل فرآیندهای التهابی می‌تواند در پیشگیری یا درمان نفروپاتی دیابتی مفید باشد. این دستورالعمل‌های درمانی متمرکز بر تعدیل مسیرهای التهابی از جمله اهدافی چون سیتوکین‌های التهابی، استرس اکسیداتیو یا بیان NF-kB خواهند بود [21].

ایز کویردو و همکارانش در سال (2012) دریافتند که پس از درمان با پاریکالسیترول در بیماران مبتلا به بیماری کلیوی، سطح نشانگرهای التهابی CRP، TNF- α ، IL-6 و IL-18 به طور قابل توجهی در سرم کاهش یافت و سطح سیتوکین ضدالتهابی IL-10 افزایش یافت. آنها بیان کردند که فعال شدن NF-kB ناشی از افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بیان بعدی سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF- α ضروری است [22].

همانطور که گفته شد، نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که بیان Bax و کاسپاز-3 در موش‌های دیابتی به طور قابل توجهی افزایش و با تجویز همزمان متفورمین و والپروات سدیم کاهش یافت. به نظر می‌رسد که اثر متفورمین به تنهایی و در ترکیب با والپروات سدیم در کاهش بیان Bax و کاسپاز-3 بیشتر از اثر هر یک به تنهایی باشد. به علاوه، اثر ترکیبی دو دارو در مقایسه با گروهی که تنها با والپروات سدیم درمان شدند، معنادار بود. بیان کلیوی پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2، الگوی معکوس تغییرات با Bax و کاسپاز-3 را نشان داد. درمان ترکیبی با متفورمین و والپروات سدیم در افزایش Bcl-2 مؤثر بود. در مجموع، این مشاهدات حاکی از اثر محافظتی متفورمین و والپروات سدیم بر آپوپتوز کلیه موش‌های دیابتی ناشی از آلوکسان بود که احتمالاً از طریق اصلاح بیان Bax، پروتئین‌های خانواده Bcl-2 و کاسپاز-3 است. والپروات سدیم، بیان Bcl2 را تغییر داده و فعال‌سازی کاسپاز-3 را مهار می‌کند که ممکن است یک مکانیسم محافظتی این ترکیب دارویی در برابر آپوپتوز در سلول‌های کلیوی آسیب دیده باشد [23]. در همین راستا، نتیجه مشابهی در یک مطالعه بر روی موش‌های تحت درمان با استرپتوزوتوسین مشاهده شد [24]. در سایر مطالعاتی که بر روی موش‌های دیابتی تحت درمان با والپروات سدیم انجام شد، اثرات کاهنده گلوکز و چربی خون و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد [25].

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که والپروات سدیم در ترکیب با متفورمین به عنوان یک عامل پلیوتروپیک همراه با مکانیسم‌های متعدد عمل و اثرات محافظتی در برابر آسیب ناشی از نفروپاتی دیابتی مطرح باشد. التهاب و استرس اکسیداتیو، مسیرهای اصلی در این نارسایی کلیوی هستند. بنابراین، انتظار می‌رود، عواملی که توانایی مقابله با این مسیرها را دارند، در بسیاری از حالات اثرات مفیدی داشته

باشند. نقش حفاظتی والپروات سدیم و یا متفورمین احتمالاً از طریق قابلیت سینرژستی این ترکیبات در سرکوب استرس اکسیداتیو، تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن، کاهش آپوپتوز از طریق تضعیف بیان کلیوی Bax در مقابل آسیب‌های ناشی از نفروپاتی دیابتی، بیان ژن کاسپاز ۳، افزایش بیان Bcl-2 و بروز پاسخ‌های ضدالتهابی است. تحت چنین پروتکل درمانی، ما شاهد ابعاد طبیعی مویرگ‌های گلومرولی همراه با اتساع کمتر مجاری صفراوی و بروز التهاب و بهبود ویژگی‌های بافتی در مقایسه با موش‌های دیابتی خواهیم بود. اثرات سینرژیک والپروات سدیم در ترکیب با متفورمین کاملاً به بیان ژن‌های ارزیابی شده در این مطالعه وابسته بود و بیان ژن‌هایی چون Sirt-1 و Bcl-2 باعث محافظت مؤثر بر عملکرد کلیه در مقایسه با موش‌های دیابتی شد. یافته‌های ما نشان داد که والپروات سدیم در ترکیب با متفورمین ممکن است جهت درمان‌های بالینی آتی در مدیریت آسیب‌های کلیوی و سایر عوارض دیابت مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات بیشتری بایستی در این زمینه انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل طرح پژوهشی خانم پریسا صابری حسن آبادی با کد اخلاقی مصوب به شماره (IR.MAZUMS.4.REC.1397.1396) از دانشگاه علوم پزشکی مازندران است. بنابراین، نویسنده مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان واحدهای دخیل در انجام این پروژه اعلام می‌دارد.

تضاد منافع

مؤلف اظهار داشته که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارد.

منابع

1. Sagoo, M.K. and Gnudi, L., 2020. Diabetic nephropathy: an overview. *Diabetic Nephropathy: Methods and Protocols*, pp.3-7.
2. Rahimi, Z., 2016. The role of renin angiotensin aldosterone system genes in diabetic nephropathy. *Canadian Journal of Diabetes*, 40(2), pp.178-183.
3. Allan, M., McCafferty, K., Sheaff, M. and Yaqoob, M.M., 2023. Identification and management of diabetic nephropathy. *Medicine*.
4. Naaman, S.C. and Bakris, G.L., 2023. Diabetic nephropathy: update on pillars of therapy slowing progression. *Diabetes Care*, 46(9), pp.1574-1586.
5. Zhang, L. and Cao, W., 2022. Histone deacetylase 3 (HDAC3) as an important epigenetic regulator of kidney diseases. *Journal of Molecular Medicine*, 100(1), pp.43-51.
6. Singh, D., Gupta, S., Verma, I., Morsy, M.A., Nair, A.B. and Ahmed, A.S.F., 2021. Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, p.112021.
7. Elsherbiny, N.M., Ahmed, E., Kader, G.A., Abdel-Mottaleb, Y., ElSayed, M.H., Youssef, A.M. and Zaitone, S.A., 2019. Inhibitory effect of valproate sodium on pain behavior in diabetic mice involves suppression of spinal histone deacetylase 1 and inflammatory mediators. *International immunopharmacology*, 70, pp.16-27.
8. Ahmed, O.M., 2001. Histopathological and biochemical evaluation of liver and kidney lesions in streptozotocin diabetic rats treated with glimepiride and various plant extracts. *J. Union Arab Biol. A*, 16, pp.585-625.
9. Liu, H., Wang, Q., Shi, G., Yang, W., Zhang, Y., Chen, W., Wan, S., Xiong, F. and Wang, Z., 2021. Emodin ameliorates renal damage and podocyte injury in a rat model of diabetic nephropathy via regulating AMPK/mTOR-mediated autophagy signaling pathway. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, pp.1253-1266.
10. Alhaider, A.A., Korashy, H.M., Sayed-Ahmed, M.M., Mobark, M., Kfoury, H. and Mansour, M.A., 2011. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through modulation of oxidative stress genes expression. *Chemico-Biological Interactions*, 192(3), pp.233-242.

11. Esmaeeli, H., The Renoprotective Effects of Sodium Valproate as a Histone Deacetylase Inhibitor on Diabetic Nephropathy. *regulation*, 7, p.9.
12. Khan, S., Kumar, S. and Jena, G., 2016. Valproic acid reduces insulin-resistance, fat deposition and FOXO1-mediated gluconeogenesis in type-2 diabetic rat. *Biochimie*, 125, pp.42-52.
13. Coughlan, M.T., Ziemann, M., Laskowski, A., Woodruff, T.M. and Tan, S.M., 2022. Valproic acid attenuates cellular senescence in diabetic kidney disease through the inhibition of complement C5a receptors. *Scientific Reports*, 12(1), p.20278.
14. Ommati, M.M., Mohammadi, H., Mousavi, K., Azarpira, N., Farshad, O., Dehghani, R., Najibi, A., Kamran, S., Niknahad, H. and Heidari, R., 2021. Metformin alleviates cholestasis-associated nephropathy through regulating oxidative stress and mitochondrial function. *Liver Research*, 5(3), pp.171-180.
15. Khan, S., Jena, G. and Tikoo, K., 2015. Sodium valproate ameliorates diabetes-induced fibrosis and renal damage by the inhibition of histone deacetylases in diabetic rat. *Experimental and molecular pathology*, 98(2), pp.230-239.
16. Shen, J., Dai, Z., Li, Y., Zhu, H. and Zhao, L., 2022. TLR9 regulates NLRP3 inflammasome activation via the NF- κ B signaling pathway in diabetic nephropathy. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 14(1), p.26.
17. Fang, L., Li, X., Luo, Y., He, W., Dai, C. and Yang, J., 2014. Autophagy inhibition induces podocyte apoptosis by activating the pro-apoptotic pathway of endoplasmic reticulum stress. *Experimental cell research*, 322(2), pp.290-301.
18. Advani, A., Huang, Q., Thai, K., Advani, S.L., White, K.E., Kelly, D.J., Yuen, D.A., Connelly, K.A., Marsden, P.A. and Gilbert, R.E., 2011. Long-term administration of the histone deacetylase inhibitor vorinostat attenuates renal injury in experimental diabetes through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *The American journal of pathology*, 178(5), pp.2205-2214.
19. Eisenreich, A. and Leppert, U., 2017. Update on the protective renal effects of metformin in diabetic nephropathy. *Current medicinal chemistry*, 24(31), pp.3397-3412.
20. Pradeep, S.R. and Srinivasan, K., 2018. Alleviation of oxidative stress-mediated nephropathy by dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and onion (*Allium cepa*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food & function*, 9(1), pp.134-148.
21. Donate-Correa, J., Luis-Rodríguez, D., Martín-Núñez, E., Tagua, V.G., Hernández-Carballo, C., Ferri, C., Rodríguez-Rodríguez, A.E., Mora-Fernández, C. and Navarro-González, J.F., 2020. Inflammatory targets in diabetic nephropathy. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), p.458.
22. Izquierdo, M.J., Cavia, M., Muñiz, P., de Francisco, A.L., Arias, M., Santos, J. and Abaigar, P., 2012. Paricalcitol reduces oxidative stress and inflammation in hemodialysis patients. *BMC nephrology*, 13(1), pp.1-7.
23. Singh, D., Gupta, S., Verma, I., Morsy, M.A., Nair, A.B. and Ahmed, A.S.F., 2021. Hidden pharmacological activities of valproic acid: A new insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, p.112021.
24. Akindede, A.J., Otuguor, E., Singh, D., Ota, D. and Benebo, A.S., 2015. Hypoglycemic, antilipidemic and antioxidant effects of valproic acid in alloxan-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 762, pp.174-183.
25. Igunnu, A., Omotehinse, A., David, O.S., Ogunsola, S. and Oyegoke, R.A., 2019. Valproic acid displays anti-diabetic and pro-antioxidant effects in high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic rats.

The synergistic reno-protective effects of valproate sodium and metformin in diabetic nephropathy mice model through attenuating the expression of pro-inflammatory and enhancing the expression of Sirt-1 and Bcl-2

Running title: Renal protective potential of sodium valproate and metformin in diabetic mice model

Dr. Parisa Saberi-Hasanabadi^{1,2*}

1. ph.D in Toxicology and pharmacology, Faculty of pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

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

Abstract

Background: This study aimed to assess the synergistic reno-preventive effects of valproate sodium (VPS) and metformin (MET) on alloxan-induced diabetic nephropathy and to elucidate their mechanisms of action through investigation of the effects on renal modulation of the pro-inflammatory expression and enhancing the expression of Sirt1 and Bcl-2.

Methods: Type 1 diabetes mice (25-30 g) models was established using a single dose i.p of alloxan (120 mgkg⁻¹), and the diabetic mice were treated with three doses of VPS (10, 20, and 40 mg/kg) and MET (200 mg/kg), respectively for a period of 28 days. Then, specific test were done to evaluate inflammatory genes expression and histopathological changes in the mice kidneys.

Results: The obtained data revealed that the treatment of diabetic mice with VPS and MET led to significant decreases in the blood glucose levels; thereby reflecting the improvement of the impaired kidney function. The treatment with MET and VPS in combination was the most potent in decreasing the elevated renal mRNA levels of inflammatory genes expressions in diabetic mice. Meanwhile, significant increase in the expression of Sirt1 and Bcl2 was observed in the kidney of diabetic mice receiving MET/VPS as compared with the diabetic group. Moreover, the treatment of diabetic mice with MET/VPS successfully prevented the diabetes-induced histopathological deleterious changes of kidney.

Conclusion: It can be concluded that MET and VPS in combination can prevent alloxan-induced diabetic nephropathy through attenuating inflammatory pathways and decreasing inflammatory genes expressions together probably with the suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis.

Keywords: Diabetes; valproate sodium; metformin; alloxan; diabetic nephropathy; reno-protective supports.