

ارزیابی آثار محافظتی رزواستاتین از طریق ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و آسیب‌اکسیداتیو بافت کبد در موش‌های صحرایی دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین

سمیرا یزدانی‌مهر^۱، دکتر محمدتقی محمدی^۲

۱) مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران، ۲) گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران، نشانی مکاتبه با نویسنده‌ی مسئول: تهران، خیابان ملاصدرا، خیابان شیخ بهایی جنوبی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دکتر محمد تقی محمدی؛
e-mail: Mohammadi.mohammad@yahoo.com

چکیده

مقدمه: توانایی ضعیف آنتی‌اکسیدانی کبد و آسیب‌اکسیداتیو نقش اساسی در ایجاد آسیب به سلول‌های کبدی در شرایط دیابت دارد. بر طبق ماهیت آنتی‌اکسیدانی رزواستاتین، هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر بهبودی رزواستاتین بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و آسیب‌اکسیداتیو بافت کبدی در دیابت بود. مواد و روش‌ها: بیست و چهار سر موش صحرایی به طور تصادفی در چهار گروه تقسیم شدند (n=۶): نرمال، نرمال درمان شده، دیابتی و دیابتی درمان شده. موش‌ها با یک تزریق داخل وریدی استرپتوزوتوسین به بیماری دیابت مبتلا شدند (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم). حیوانات درمان شده، رزواستاتین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به طور روزانه توسط لوله‌ی گاوژ برای شصت روز دریافت کردند. در پایان، نمونه‌ی خونی جهت ارزیابی میزان گلوکز و بافت کبدی برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدهید، گلوکاتایون و NOX (نیترات و نیتريت) و هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکساید‌دیسموتاز جمع‌آوری شدند. یافته‌ها: القای دیابت (گلوکز خون 300 میلی‌گرم در یک صد میلی‌لیتر) باعث افزایش معنی‌دار مقدار مالون‌دی‌آلدهید ($4/00 \pm 0/44$ میکرومول در لیتر) در مقایسه با گروه نرمال ($1/08 \pm 0/39$ میکرومول در لیتر) شد، در حالی‌که رزواستاتین بدون تاثیر بر گلوکز خون به طور معنی‌داری ($2/42 \pm 0/56$ میکرومول در لیتر) آن را کاهش داد. دیابت میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکساید‌دیسموتاز را به ترتیب ۸۱ درصد و ۵۴ درصد کاهش داد. درمان با رزواستاتین باعث افزایش معنی‌دار فعالیت کاتالاز (۹۰ درصد) و مقدار گلوکاتایون (۶۵ درصد) در موش‌های دیابتی شد. هم‌چنین، دیابت به طور معنی‌داری مقدار NOX (15 ± 1 میکرومول در لیتر) را در مقایسه با گروه نرمال (34 ± 15 میکرومول در لیتر) کاهش داد، در حالی‌که رزواستاتین به طور معنی‌داری آن را افزایش داد (61 ± 16 میکرومول در لیتر). نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان می‌دهد رزواستاتین قادر است توانایی آنتی‌اکسیدانی کبد دیابتی را افزایش دهد. بنابراین، درمان با رزواستاتین ممکن است آسیب‌های بافتی و اکسیداتیو کبد را در شرایط دیابتی بهبود بخشد.

واژگان کلیدی: رزواستاتین، دیابت شیرین، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آسیب‌اکسیداتیو، هیپرگلیسمی

دریافت مقاله: ۹۶/۵/۱ - دریافت اصلاحیه: ۹۶/۱۰/۱۳ - پذیرش مقاله: ۹۶/۱۱/۴

مقدمه

بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت کبد افزایش می‌یابد.^{۱،۲} این رادیکال‌های فعال به دلیل واکنش‌پذیری بسیار بالا با ماکرومولکول‌های مهم و حیاتی سلول، از جمله اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپیدها، باعث اختلال در عملکرد حیاتی سلول‌ها می‌شوند.^{۳،۴} کبد هم مانند سایر اعضای بدن تحت

در دیابت شیرین، تولید انواع رادیکال‌های آزاد، همانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)،^۱ به صورت گسترده در

i - Reactive oxygen species

مشخص شد رزواستاتین از کارسینومای سلول‌های کبدی در موش‌های صحرایی مبتلا به NAFLD جلوگیری می‌کند که این شرایط بیشتر در افراد چاق دیابتی و یا بیماری سندرم متابولیک رخ می‌دهد.^{۱۳}

با توجه به این نکته که بر اساس جستجوهای انجام شده، تحقیقی درباره‌ی تاثیر داروی رزواستاتین بر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی کبد در زمان دیابت، یافت نشد و همچنین با در نظر گرفتن اثرات مفید رزواستاتین،^{۹،۱۶} در مطالعه‌ی حاضر تأثیر رزواستاتین بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، آسیب اکسیداتیو و در نهایت میزان تولید نیتریک اکساید در بافت کبد در موشهای صحرایی نر بالغ دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات و نحوه‌ی نگهداری: در این تحقیق که یک مطالعه مداخله‌ای - تجربی بود، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار تهیه شده از مرکز پژوهشی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله در محدوده‌ی وزنی ۲۲۰-۱۹ گرم استفاده شد. در تمامی آزمایش‌ها شرایط کار با حیوانات آزمایشگاهی تعیین شده، توسط کمیته اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله رعایت شد. کد کمیته‌ی اخلاق برای مطالعه‌ی حاضر IR.BMSU.REC.1396.169 بود. حیوانات بدون داشتن محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی با درجه حرارت ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد) در طی آزمایش نگهداری شدند.

نحوه‌ی القای دیابت شیرین: برای ایجاد دیابت شیرین نوع اول از استرپتوزوتوسین (سیگما، USA) استفاده شد. حیوانات توسط داروی ترکیبی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و دیازپام (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس از محلول از پیش تهیه شده استرپتوزوتوسین (به میزان ۴۰ میلی‌گرم به‌ازای یک کیلوگرم وزن بدن) از راه ورید جانبی دم به حیوان تزریق شد.^{۱۷،۱۸} ۷۲ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، میزان قند خون اندازه‌گیری شد و حیواناتی که گلوکز سرمی بالای ۳۰۰ میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر داشتند به عنوان حیوان دیابتی انتخاب و وارد دوره‌ی آزمایش شدند.

گروه‌بندی حیوانات: در این مطالعه، موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند (N=۲۴): گروه نرمال، گروه نرمال دریافت‌کننده‌ی رزواستاتین

تاثیر دیابت قرار گرفته و دچار بیماری کبد چرب غیرالکی (NAFLD)ⁱ می‌شود که با برخی تغییرات عملکردی در بافت کبد همراه است.^۵ بر پایه‌ی شواهد، افزایش تجمع رادیکال‌های آزاد در بافت کبد در ایجاد این نوع بیماری کبدی طی دیابت نقش کلیدی دارد.^{۶،۷} همچنین، بروز آسیب‌های کبدی و در نهایت ایجاد سیروز، یکی از عواقب دیابت مزمن و کنترل نشده است که بروز آسیب اکسیداتیو به همراه التهاب در پیشبرد آن نقش اساسی دارد.^۶ نتایج تحقیقات نشان می‌دهند طی دیابت، اکسیداسیون اسیدهای چرب آزاد و فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها به دلیل تجمع رادیکال‌های آزاد در بافت کبد افزایش می‌یابد و منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی در هپاتوسیت‌های کبدی می‌شود.^۸ در طی دیابت، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت کبد، که در شرایط طبیعی مسئولیت حذف و جلوگیری از تجمع این رادیکال‌ها را بر عهده دارد، به شدت تضعیف می‌شود.^۷ در این میان می‌توان به کاهش فعالیت آنزیم‌های مرتبط، همچون سوپراکساید دیسموتاز و کاتالاز اشاره کرد که باعث آسیب اکسیداتیو در این بافت می‌شود.^{۱۶}

استاتین‌ها جزء مهارکننده‌های رقابتی آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوٹاتریل کوآنزیم-آ ردوکتازⁱⁱ هستند که از طریق مهار کبدی این آنزیم سبب کاهش کلسترول خون می‌شوند. مطالعات اخیر اثرات بسیار سودمندی از این داروها در برخی شرایط پاتولوژیک مستقل از اثرات کاهندگی کلسترول خون گزارش کرده‌اند.^{۹-۱۱} این داروها علاوه بر خاصیت پایین آوردن کلسترول و تری‌گلیسیرید خون، دارای اثرات ضدالتهابی، گشادکنندگی عروقی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوزی هستند.^{۹،۱۱} در این بین، اثرات مفید رزواستاتین بر روی کبد در برخی از اختلالات پاتولوژیک گزارش شده است.^{۱۲،۱۳} بررسی‌های انجام شده در بیمارانی که دچار سندرم متابولیک بودند، نشان می‌دهد رزواستاتین از آسیب کبدی و بروز NAFLD جلوگیری می‌کند و خطر بروز بیماری‌های قلبی-عروقی را در این بیماران کاهش می‌دهد.^{۱۴،۱۵} در مطالعه‌ی دیگر، کارکیوتیسⁱⁱⁱ و همکارانش اثرات ممانعت‌کننده‌ی رزواستاتین در مقابل التهاب کبدی و آسیب به هپاتوسیت‌ها را در افراد دارای کلسترول خون بالا و اختلالات لیپیدی گزارش کردند.^{۱۴} همچنین در تحقیقی دیگر

i - Nom-alcoholic fatty liver disease

ii - 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase

iii - Karqiotis

نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (CECIL-2501, England) قرائت شد و غلظت گلوکز خون (میلی‌گرم در دسی لیتر) از فرمول زیر محاسبه شد:

گلوکز خون (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر) = [جذب نوری نمونه ÷ جذب نوری استاندارد] × غلظت محلول استاندارد (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)

اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها: برای تعیین میزان مالون‌دی‌آلدهید بافت کبد، ابتدا بافت منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنیزه شده و پس از آن نمونه‌ها در ۴ و ۱۴۰۰۰ g و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. در ادامه، به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه، ۱/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی را برداشته و ۲ میلی‌لیتر اسیدتیوباربیتوریک ۰/۱۷٪ 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 صورتی رنگ به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت مالون‌دی‌آلدهید، با استفاده از ۱، ۳ و ۳ تترا اتوکسی‌پروپان به عنوان استاندارد، بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. محلول استاندارد مالون‌دی‌آلدهید در غلظت‌های ۲۰-۲/ میکرومولار در اسیدسولفوریک ۱۰٪ تهیه گردید. در نهایت مقدار مالون‌دی‌آلدهید برحسب میکرومول در لیتر ارائه شد.^{۱۹}

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کبد: در روز آزمایش، بافت‌های منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنیزه شده و پس از آن نمونه‌ها در ۴ و ۱۴۰۰۰ g و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز و همچنین مقدار گلوتاتیون استفاده شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز، ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA ۰/۱ مولار در سدیم سیانید ۰/۳ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر نیتروبولوتترانزولایوم (NBT) ۱/۵ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر بافت هموژنیزه (یا بافر برای کنترل) به یک کووت اضافه و بعد از مخلوط کردن به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۰/۰۵

(نرمال و رزواستاتین)، گروه دیابتی، گروه دیابتی دریافت‌کننده رزواستاتین (دیابتی و رزواستاتین). گروه نرمال شامل موش‌های صحرایی سالمی بودند که در طول آزمایش هیچ دارویی مصرف نکرده و روزانه یک میلی‌لیتر آب مقطر به صورت دهانی و به مدت ۲ ماه دریافت کردند. در گروه نرمال و رزواستاتین، تمامی پروتکل‌های آزمایش شبیه گروه نرمال بوده با این تفاوت که حیوانات این گروه به مدت ۲ ماه داروی رزواستاتین (AstraZeneca, UK) به مقدار ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت روزانه از طریق دهانی توسط لوله گاوژ دریافت کردند. حیوانات گروه دیابتی ۳ روز پس از ثابت شدن علائم دیابت (پرنوشی، پرادراری و گلوکز خون بالا) و اطمینان از حصول دیابت به عنوان گروه کنترل دیابتی در نظر گرفته شدند. حیوانات این گروه در طول آزمایش، هیچ دارویی مصرف نکردند و تنها یک میلی‌لیتر آب مقطر روزانه و به مدت ۲ ماه از طریق دهانی دریافت کردند. در حیوانات گروه دیابتی و رزواستاتین تمامی انجام مراحل آزمایش از جمله القای دیابت شبیه گروه دیابتی بود، با این تفاوت که در طی دوره آزمایش با داروی رزواستاتین (به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت روزانه از طریق دهانی تیمار شدند.

در انتهای آزمایش، حیوانات تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و پس از خون‌گیری، بافت کبد جدا و به سرعت به داخل نیتروژن مایع و سپس به فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. سرم خون به وسیله دستگاه سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) جدا شد. از سرم‌های جدا شده میزان گلوکز خون به وسیله دستورالعمل شرکت پارس آزمون به شرح زیر مورد سنجش قرار گرفت.

اندازه‌گیری غلظت گلوکز خون: جهت اندازه‌گیری گلوکز خون از کیت تشخیص کمی گلوکز خون به روش نورسنجی (پارس آزمون، ایران) استفاده شد. در این روش، آب اکسیژنه‌ی آزاد شده از گلوکز در مجاورت آنزیم گلوکز اکسیداز با فنول و ۴-امینو آنتی پیرین در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کینونیمین می‌دهد. میزان کینونیمین تشکیل شده که با روش نورسنجی قابل اندازه‌گیری است، با مقدار گلوکز رابطه کاملاً مستقیم دارد. بدین‌منظور با استفاده از سمپلر، ۱۰ میکرولیتر از نمونه (سرم تهیه شده) یا محلول استاندارد را با ۱۰۰۰ میکرولیتر از معرف کیت تشخیص گلوکز مخلوط نموده و پس از ۲۰ دقیقه انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب نوری در طول موج ۵۶۶

میلی لیتر ربیوفلاوین ۰/۱۲ میلی مولار در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۶۷ مولار $\text{pH}=7/8$ اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. سپس جذب در طی ۵ دقیقه در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز مقدار آنزیم مورد نیاز است تا ۵۰ درصد از سرعت احیاء NBT مهار شود. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی لیتر محاسبه گردید.^{۲۰}

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز به حجم معینی از عصاره بافتی، اتانول مطلق (۰/۰۱ میلی لیتر در میلی لیتر) اضافه شد و مدت ۳۰ دقیقه در یخ اینکوبه گردید. سپس تریتون X-100 ده درصد با غلظت نهایی یک درصد اضافه شد. این محلول جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم به کار برده شد. واکنش با اضافه کردن ۰/۰۵ میلی لیتر H_2O_2 ۳۰ میلی مولار به نمونه بافتی در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار $\text{pH}=7$ شروع شد. سپس جذب در طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. یک واحد فعالیت کاتالاز، مقدار یک میکرومول از H_2O_2 است که در یک دقیقه تجزیه می شود. فعالیت آنزیم بر حسب واحد بر میلی لیتر محاسبه شد.^{۲۱}

برای سنجش میزان گلوکاتایون غلظت مناسبی از نمونه هموژنه با ۱۰ میکرو لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی برداشته به ۸۱۰ میکرو لیتر دی سدیم فسفات ۰/۳ مولار اضافه شد. سپس با اضافه کردن ۹۰ میکرو لیتر معرف دی تیو-بیس-نیتروبنزویک اسید (DTNB) ۰/۴ درصد محلول در سیترات سدیم ۱ درصد واکنش شروع گردید. تغییرات جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر در طی ۵ دقیقه قرائت شد. با استفاده از محلول گلوکاتایون ۱ میلی گرم بر میلی لیتر منحنی استاندارد گلوکاتایون رسم گردیده و غلظت گلوکاتایون بر حسب میکرومول در لیتر محاسبه گردید. محلول استاندارد گلوکاتایون در غلظت های ۲۰۰-۲۵ میکرو مولار تهیه شد.^{۲۱}

اندازه گیری سطح NOx (مجموع نیترات و نیتريت)

بافت کبد: ابتدا بافت کبد منجمد شده به دقت توزین و به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات سالین هموژنیزه شده و پس از آن نمونه ها در ۱۴۰۰۰ g و ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از محلول رویی جهت سنجش NOx استفاده شد. سپس با استفاده از سولفات روی، پروتئین زدایی نمونه ها انجام شده و ۱۰۰ میکرو لیتر محلول کلرید

وانادیوم III (۸ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد تا نیترات را به نیتريت احیا کند. سپس محلول گریس شامل ۵۰ میکرو لیتر سولفانیل آمید (۲٪) و ۵۰ میکرو لیتر اتیلین دی آمید دی هیدروکلرید (۱٪) اضافه گردیده و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس رنگ به دست آمده در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده و جذب نمونه ها با جذب استاندارد (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرو مولار نیتريت) مقایسه و غلظت نمونه ها محاسبه گردید. در نهایت غلظت NOx بر حسب میکرومول در لیتر بیان شد.^{۱۹}

به منظور ارزیابی دقت روش اندازه گیری های مربوط به تست های بیوشیمیایی، از آزمون های درون سنجش و برون سنجش نمونه هایی با غلظت متوسط و تکرار شش گانه برای پارامترهای مورد نظر استفاده شد. درصد تغییرات درون آزمونی و برون آزمونی به ترتیب برابر با ۷/۴ درصد و ۸/۱ درصد برای مالون دی آلدهید، ۲/۲ درصد و ۲/۷ درصد برای گلوکاتایون و ۵/۳ درصد و ۷/۱ درصد برای NOx به دست آمد. همچنین درصد تغییرات درون آزمونی و برون آزمونی به ترتیب برابر با ۱۰/۲ درصد و ۱۰/۶ درصد برای آنزیم کاتالاز و ۴/۱ درصد و ۵/۵ درصد برای آنزیم سوپراکساید دیسموتاز بود.

بررسی های آسیب شناختی بافت کبد: بدین منظور، در پایان آزمایش، حیوانات تحت بیهوشی عمیق کشته شدند و بافت کبد بعد از خارج شدن جهت تثبیت به مدت دو هفته در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. به دنبال آن مراحل آماده سازی بافت، قالب گیری با پارافین مطابق روش های روتین انجام گرفته و برش گیری توسط دستگاه میکروتوم با ضخامت ۵ میکرومتر انجام شد. مقاطع تهیه شده در محل مورد نظر، پس از انتقال بر روی لام با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. در نهایت مراحل آب گیری، شفاف سازی و فرآیند مانند کردن صورت پذیرفت. لام های حاصل توسط میکروسکوپ نوری (Nikon) مورد ارزیابی قرار گرفتند و به کمک دوربین مخصوص میکروسکوپ متصل به کامپیوتر (CMEX)، از نقاط مورد نظر تصاویر تهیه شد و شاخص های نکروز سلولی (حاوی هسته های پیکنوت، متراکم و چروکیده) و تخریب بافتی (واکوئولیزاسیون) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

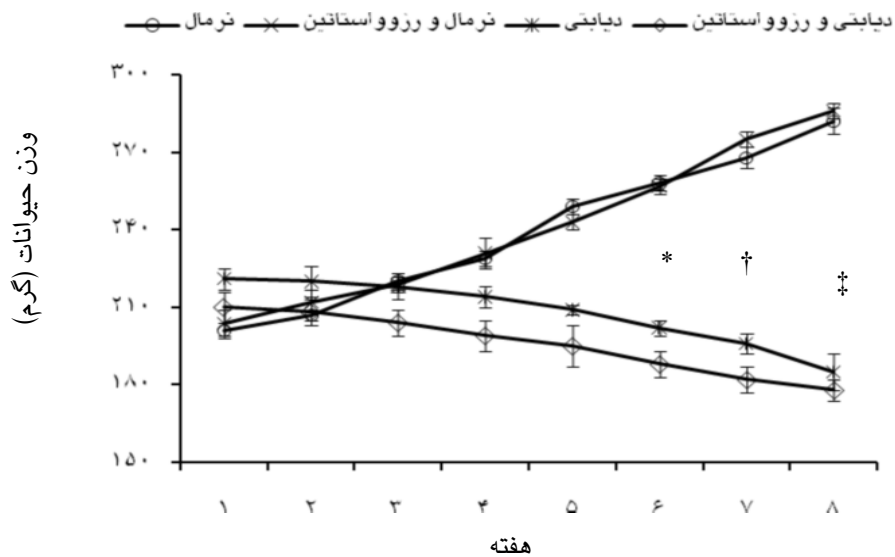
آنالیز آماری: نتایج آماری به صورت میانگین \pm خطای استاندارد میانگین (Mean \pm SEM) ارائه شده است. داده ها با

استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ تحلیل شدند و از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف^۱ برای نشان دادن توزیع نرمال داده ها استفاده شد. از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) برای تحلیل داده های گلوکز خون، مقدار مالون دی آلدئید، فعالیت آنزیم کاتالاز و مقدار گلوکوتایون و از آزمون تعقیبی LSD برای داده های فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز و مقدار

استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ تحلیل شدند و از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف^۱ برای نشان دادن توزیع نرمال داده ها استفاده شد. از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با آزمون تعقیبی توکی (Tukey) برای تحلیل داده های گلوکز خون، مقدار مالون دی آلدئید، فعالیت آنزیم کاتالاز و مقدار گلوکوتایون و از آزمون تعقیبی LSD برای داده های فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز و مقدار

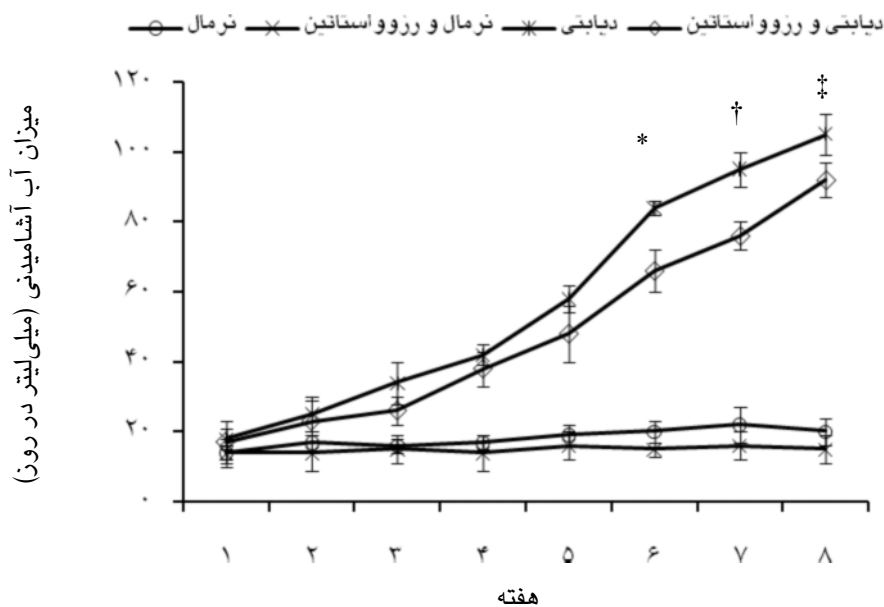
یافته ها

تغییرات وزن حیوانات و میزان مصرف آب آشامیدنی:
نتایج مربوط به تغییرات وزن حیوانات و میزان مصرف آب آشامیدنی آنها به ترتیب در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۱- تغییرات وزن حیوانات (گرم) در گروه های مورد مطالعه در طول دوره آزمایش. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند.

* و † و ‡ به ترتیب نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ و $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه با گروه نرمال در همان روز



نمودار ۲- تغییرات میزان مصرف آب آشامیدنی حیوانات (میلی لیتر در روز) در گروه های مورد مطالعه در طول دوره آزمایش. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند.

* و † و ‡ به ترتیب نشانگر تفاوت معنی دار با $P < 0.05$ و $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه با گروه نرمال در همان روز

رزوواستاتین بر میزان مصرف آب آشامیدنی همچون وزن حیوانات در هر دو گروه نرمال و دیابتی بی‌تاثیر بود.

نتایج گلوکز خون: میزان گلوکز خون حیوانات مورد مطالعه در پایان آزمایش در تمامی گروه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

میزان وزن حیوانات نرمال در طول آزمایش در حال افزایش بود. در حالی که میزان وزن در حیوانات دیابتی در طول آزمایش در حال کاهش بود. تیمار با رزوواستاتین بر میزان تغییرات وزن حیوانات نرمال و دیابتی تاثیری نداشت. همچنین، میزان مصرف آب آشامیدنی در حیوانات گروه نرمال در طول آزمایش بدون تغییر بود، اما در حیوانات گروه دیابتی در طول دوره آزمایش افزایش یافت. تیمار با

جدول ۱- تغییرات غلظت گلوکز خون (میلی‌گرم بر یک صد میلی‌لیتر)، سطوح غلظت‌های مالون دی‌آلدهید (میکرومول بر لیتر)، گلوکاتایون (میکرومول بر لیتر) و NOx (میکرومول بر لیتر) بافت کبد و همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (واحد بر میلی‌لیتر) و سوپراکساید دیسموتاز (واحد بر میلی‌لیتر) بافت کبد در گروه‌های مورد مطالعه.

متغیرها	گروه‌ها	نرمال	نرمال و رزوواستاتین	دیابتی	نرمال و رزوواستاتین
گلوکز خون (میلی‌گرم بر یک صد میلی‌لیتر)	۱۴۴±۱۰	۱۳۱±۸	۳۳۵±۲۳ [†]	۳۴۸±۴۱ [†]	
مالون‌دی‌آلدهید (میکرومول بر لیتر)	۱/۰۸±۰/۳۹	۲/۴۲±۰/۵۶	۴/۰۰±۰/۴۴ [†]	۱/۲۲±۰/۷۴ [§]	
کاتالاز (واحد بر میلی‌لیتر)	۰/۱۱±۰/۰۲	۰/۰۵±۰/۰۱	۰/۰۲±۰/۰۲*	۰/۲۲±۰/۰۷	
سوپراکساید دیسموتاز (واحد بر میلی‌لیتر)	۶۲±۱۴	۳۶±۱۸	۲۸±۳	۳۸±۱۱	
گلوکاتایون (میکرومول بر لیتر)	۲۸۴±۱۰	۳۷۴±۱۸	۳۴۱±۱۶	۹۹۰±۶۸	
NOx (میکرومول بر لیتر)	۴۳±۱۵	۵۲±۷	۱۵±۱*	۶۱±۱۶	

داده‌ها به صورت Mean±SEM نشان داده شده‌اند. * و † و ‡ به ترتیب نشان‌گر تفاوت معنی‌دار با P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه نرمال، § و || به ترتیب نشان‌گر تفاوت معنی‌دار با P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی

بافت کبد در حیوانات گروه کنترل دیابتی (۴/۰۰±۰/۴۴) میکرومول در لیتر) در مقایسه با گروه نرمال (۱/۰۸±۰/۳۹) میکرومول در لیتر) به طور معنی‌داری افزایش یافت (P=۰/۰۰۲). تیمار با رزوواستاتین، میزان مالون‌دی‌آلدهید بافت کبد گروه دیابتی درمان شده (۱/۵۲±۰/۷۴) میکرومول در لیتر) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی را به طور معنی‌داری کاهش داد (P=۰/۰۱۱). در حالی که تیمار با رزوواستاتین، تأثیر معنی‌داری در میزان مالون‌دی‌آلدهید بافت کبد در گروه نرمال درمان شده (۲/۴۲±۰/۵۶) میکرومول در لیتر) در مقایسه با گروه کنترل نرمال ایجاد نکرد.

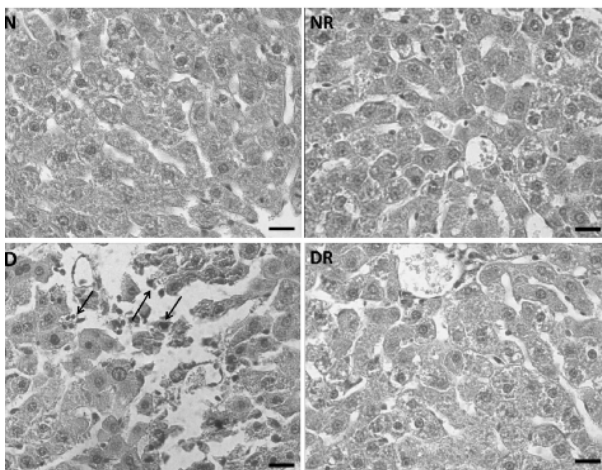
نتایج فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کبد: تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کبد بر حسب واحد بر میلی‌لیتر در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بافت کبدی در حیوانات گروه‌های نرمال و نرمال تیمار شده با رزوواستاتین به ترتیب برابر با ۰/۱۱±۰/۰۲ و ۰/۰۵±۰/۰۱ واحد بر میلی‌لیتر بود که از لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد. القای دیابت میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت کبد را در حیوانات گروه کنترل دیابتی

میزان گلوکز خون حیوانات گروه نرمال و نرمال دریافت‌کننده رزوواستاتین در پایان آزمایش به ترتیب برابر با ۱۴۴±۱۰ و ۱۳۱±۸ میلی‌گرم در یک صد میلی‌لیتر بود که مقایسه آماری بین آن‌ها تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌داد. القای دیابت، میزان گلوکز خون را در حیوانات گروه دیابتی در مقایسه با گروه نرمال به طور معنی‌داری افزایش داد (P=۰/۰۰۲)، که میزان آن در پایان آزمایش برابر ۳۳۵±۲۳ میلی‌گرم در یک صد میلی‌لیتر بود. همچنین القای دیابت، میزان گلوکز خون را در حیوانات گروه دیابتی درمان شده با رزوواستاتین در مقایسه با گروه نرمال به طور معنی‌داری افزایش داد (P=۰/۰۰۱)، که مقدار آن در پایان آزمایش برابر ۳۴۸±۴۱ میلی‌گرم در یک صد میلی‌لیتر بود. نهایتاً، در مقایسه آماری، گلوکز خون حیوانات گروه کنترل دیابتی و دیابتی درمان شده با رزوواستاتین تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

نتایج مربوط به تغییرات مالون‌دی‌آلدهید: تغییرات میزان مالون‌دی‌آلدهید بافت کبد بر حسب میکرومول در لیتر در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان مالون‌دی‌آلدهید

NOx بافت کبد را در حیوانات گروه کنترل دیابتی (15 ± 0.8) میکرومول در لیتر) در مقایسه با گروه نرمال (43 ± 15) میکرومول در لیتر) به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد ($P=0.008$). تیمار با رزوواستاتین در طول دوره آزمایش تأثیر معنی‌داری بر میزان NOx بافت کبدی حیوانات گروه نرمال درمان شده (52 ± 7) میکرومول در لیتر) در مقایسه با گروه کنترل نرمال ایجاد نکرد. در حالی که تیمار با رزوواستاتین در طی دوره آزمایش سطح NOx بافت کبدی در حیوانات گروه دیابتی درمان شده (61 ± 16) میکرومول در لیتر) را در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به طور معنی‌داری افزایش داد ($P=0.009$).

نتایج تغییرات آسیب‌شناختی بافت کبد: همان‌طور که تصاویر میکروسکوپی تهیه شده از بافت کبد (شکل ۱) نشان می‌دهد، در حیوانات گروه نرمال و نرمال درمان شده با رزوواستاتین، بافت کبد و هپاتوسیت‌های کبدی سالم به نظر می‌رسند. در حیوانات گروه دیابتی، تخریب در بافت کبدی به همراه سلول‌های پیکنوت و نکروز شده (هسته‌های متراکم و چروکیده) به وضوح قابل مشاهده است. میزان این صدمات در بافت کبد حیوانات دیابتی درمان شده با رزوواستاتین به مقدار زیادی کاهش یافته است.



شکل ۱- مقاطع عرضی بافت کبد با روش رنگ‌آمیزی هوماتوکسیلین و ائوزین در گروه‌های نرمال (N)، نرمال درمان شده با رزوواستاتین (NR)، دیابتی (D) و دیابتی درمان شده با رزوواستاتین (DR). در گروه دیابتی تخریب بافت کبد به همراه سلول‌های نکروز شده و پیکنوت به وضوح مشاهده می‌شود (Scale bars: 20 μm , 400X).

(0.2 ± 0.02 واحد بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه نرمال به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش داد. در حالی که، تیمار با رزوواستاتین میزان فعالیت این آنزیم در حیوانات گروه دیابتی درمان شده (0.22 ± 0.07 واحد بر میلی‌لیتر) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی را به طور معنی‌داری افزایش داد ($P=0.004$).

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز: میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز بافت کبد بر حسب واحد بر میلی‌لیتر در جدول ۱ نشان داده شده است. میانگین فعالیت این آنزیم در گروه‌های نرمال و نرمال تیمار شده با رزوواستاتین در طول دوره آزمایش به ترتیب برابر یا 62 ± 14 و 36 ± 18 واحد بر میلی‌لیتر بود که از لحاظ آماری، تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد. القای دیابت میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز بافت کبدی را در حیوانات گروه کنترل دیابتی (28 ± 3) واحد بر میلی‌لیتر) را در مقایسه با گروه نرمال کاهش داد، هر چند این کاهش از لحاظ آماری، معنی‌دار نبود ($P=0.099$). بین میزان فعالیت این آنزیم در حیوانات گروه دیابتی درمان شده (38 ± 11) واحد بر میلی‌لیتر) با گروه کنترل دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت که علت آن احتمالاً به دلیل تعداد کم نمونه در هر گروه با توجه به محدودیت انتخاب نمونه به دلیل شرایط آزمایش است.

نتایج تغییرات گلوکوتایون بافت کبد: جدول ۱ تغییرات میزان گلوکوتایون بافت کبد بر حسب میکرومول در لیتر را نشان می‌دهد. تیمار با رزوواستاتین در حیوانات گروه نرمال درمان شده (374 ± 18) میکرومول در لیتر) و القا دیابت در حیوانات گروه کنترل دیابتی (341 ± 16) میکرومول در لیتر) تأثیر معنی‌داری بر میزان گلوکوتایون بافت کبد در مقایسه با گروه کنترل نرمال (284 ± 10) میکرومول/لیتر) ایجاد نکرد. در حالی که تیمار با رزوواستاتین در طی دوره آزمایش سطح گلوکوتایون بافت کبدی در حیوانات گروه دیابتی درمان‌شده (990 ± 68) میکرومول در لیتر) در مقایسه با گروه کنترل دیابتی را به طور معنی‌داری افزایش داد ($P=0.001$).

نتایج تغییرات NOx بافت کبد: تغییرات غلظت NOx (شاخص تولید نیتریک اکساید) بافت کبد بر حسب میکرومول در لیتر در جدول ۱ نشان داده شده است. القای دیابت، سطح

بحث

ایجاد دیابت در مطالعه‌ی حاضر، باعث تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت کبد شد، به طوری که میزان فعالیت آنزیم‌های این سیستم همچون کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز در بافت کبد حیوانات دیابتی کاهش یافت. بر این اساس، میزان مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز آسیب اکسیداتیو در بافت کبد حیوانات دیابتی به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا کرد. رزواستاتین در حیوانات دیابتی درمان شده، از طریق تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کبد (افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز و همچنین افزایش میزان گلوتاتیون)، تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز آسیب اکسیداتیو (کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید) بافت کبدی را کاهش داد. همچنین نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد، رزواستاتین میزان NOx (شاخص تولید نیتریک‌اکساید) در بافت کبد حیوانات دیابتی که در طی دیابت کاهش پیدا کرده بود، را افزایش می‌دهد.

گلوکز بالای خون (هیپرگلیسمی) در طی دیابت باعث صدمات مختلف ساختاری و عملکردی در بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت کبد می‌شود.^{۶۸} تجمع رادیکال‌های آزاد در بافت کبد در حین دیابت نقش کلیدی در ایجاد این آسیب‌ها در بافت کبد دارد و طبق گزارشات، در ایجاد بیماری کبد چرب غیرالکلی که در طی دیابت ایجاد شده، نقش دارد.^{۶۷} در مطالعه‌ی حاضر همچون سایر تحقیقات مرتبط، میزان تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و بروز آسیب اکسیداتیو (افزایش میزان مالون‌دی‌آلدهید) در بافت کبد حیوانات دیابتی افزایش پیدا کرد. تجمع این رادیکال‌ها در بافت کبد، باعث اکسیداسیون اسیدهای چرب و پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود.^۸ این تغییرات باعث صدمه به سلول‌ها و بافت کبد می‌شود که میزان و شدت این آسیب‌ها به وضوح در بررسی‌های آسیب شناختی قابل مشاهده بود. استرس اکسیداتیو مزمن در بافت کبد همچنین باعث فعال شدن یا غیرفعال شدن برخی از سیگنال‌های مربوط به چرخه سلولی در سلول‌های کبدی شده که توان تکثیر و ترمیم این سلول‌ها را کاهش داده و فرآیند آپوپتوز و مرگ سلولی هپاتوسیت‌های کبدی را تسریع می‌کند.^{۲۲} همچنین استرس اکسیداتیو سبب تجمع سیتوکاین‌های پیش‌التهابی همچون فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (TNF- α) و اندوتوکسین‌های

باکتریال در بافت کبد و در نهایت باعث سیروز کبدی و التهاب در این بافت می‌شود.^{۲۳} دلایل متعددی وجود دارد که دیابت از طریق آن‌ها سبب تجمع رادیکال‌های آزاد در بافت کبد و آسیب اکسیداتیو می‌شود. یافته‌های متعدد نشان می‌دهند، دیابت مزمن سبب تضعیف ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کبد می‌شود.^۶ یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نیز نشان‌دهنده تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت کبد در حیوانات دیابتی بود، چرا که میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (به طور معنی‌دار) و سوپراکساید دیسموتاز در بافت کبد حیوانات دیابتی کاهش یافت. هیپرگلیسمی همچنین طی دیابت مستقیماً از طریق فعال کردن چندین مسیر باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود که می‌توان به مسیر پلی-اول، پروتئین کیناز-C و افزایش فعالیت و میزان برخی آنزیم‌های پرواکسیدان همچون گزانتین-اکسیداز و NADPH-اکسیداز اشاره کرد.^{۷،۲۴}

در مطالعه‌ی حاضر، تیمار با رزواستاتین بر میزان گلوکز خون تاثیری نداشت. در ارتباط با اثر رزواستاتین بر میزان گلوکز خون نتایج متناقضی ارائه شده است. برخی مطالعات اثرات کاهش‌دهنده گلوکز خون را در برخی از مدل‌های دیابتی به ویژه نوع دوم گزارش کرده‌اند.^{۲۵} در حالی که برخی دیگر اثرات دیابت‌زای این دسته از داروها را در برخی تحقیقات دیگر ارائه داده‌اند.^{۲۶،۲۷} به هر حال توافق قابل قبولی از این دسته از داروها بر روی گلوکز خون وجود ندارد. آنچه از نتایج مطالعه حاضر به دست می‌آید این است که استفاده از رزواستاتین بر گلوکز خون حیوانات دیابتی بی‌تاثیر است. این عدم تاثیر شاید به دلیل استفاده از دیابت نوع اول در مطالعه حاضر است که میزان انسولین به دلیل القای دیابت و تخریب سلول‌های بتای پانکراس کاهش پیدا کرده است. در مطالعه‌ی حاضر، استفاده از رزواستاتین طی دیابت میزان مالون‌دی‌آلدهید (شاخص پراکسیداسیون لیپیدها و تجمع رادیکال‌های آزاد) بافت کبدی را به طور معنی‌داری کاهش داد. بر اساس این نتایج، رزواستاتین می‌تواند آسیب اکسیداتیو و تجمع رادیکال‌های آزاد در بافت کبد دیابتی را کاهش دهد. این اثرات استاتین‌ها، از جمله رزواستاتین، در برخی شرایط پاتولوژیک دیگر نیز در برخی بافت‌های بدن گزارش شده است.^{۱۶،۲۸} بنابراین به نظر می‌رسد رزواستاتین در مطالعه‌ی حاضر، مشابه سایر مطالعات، با خاصیت

برخی از بافت‌های بدن از جمله بافت کلیه و کبد شد، به طوری که استفاده از مهارکننده‌های آنزیم نیتریک اکساید سنتاز از افزایش تولید آن جلوگیری کرد.^{۳۴} در نهایت مشخص شد دیابت از طریق افزایش میزان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز نوع القایی که به دلیل فاکتور نسخه برداری-KappaB فعال می‌شود، می‌تواند میزان نیتریک اکساید بافت کبدی را افزایش دهد.^{۳۵} گرچه این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر متفاوت است، اما به نظر می‌رسد مدل ایجاد دیابت، تغییرات میزان قند خون و طول دوره دیابت از طریق فعال کردن یا غیر فعال کردن نوع آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (اندوتلیالی یا القایی) باعث ایجاد این نتایج متفاوت شده است که البته نیاز به مطالعات گسترده‌تری برای اثبات این حقیقت وجود دارد. از طرفی تیمار با رزوواستاتین طی دیابت میزان NOx بافت کبدی را در حیوانات دیابتی درمان شده افزایش داد. استفاده از داروهای گروه استاتین‌ها منجر به رزوواستاتین باعث بهبود عملکرد عروق از طریق افزایش میزان تولید نیتریک اکساید می‌شود.^{۳۶} در تحقیقی، استفاده از رزوواستاتین از طریق افزایش تولید نیتریک اکساید در بافت عصبی از نوروپاتی دیابتی و آسیب عروقی ناشی از هیپرگلیسمی در بافت عصبی جلوگیری کرد.^{۳۷} همین‌طور در مطالعه هیانگ،^{۳۸} درمان ترکیبی مهارکننده پروتئین کیناز C- و رزوواستاتین از طریق فعال کردن برخی مسیرهای مربوط به آنژیوژنز و افزایش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی باعث بهبود ضایعه ناشی از ایسکمی قلبی شد.^{۳۹} بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد رزوواستاتین در طی دیابت می‌تواند از آسیب به بافت کبدی از طریق افزایش تولید نیتریک اکساید و همچنین افزایش فراهم‌زیستی آن به واسطه کاهش استرس اکسیداتیو جلوگیری کرده و باعث بهبود عملکرد عروقی و مانع آسیب بافتی شود.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تعداد کم نمونه‌ها در گروه‌هایی که آنزیم سوپراکساید دیسموتازشان اندازه‌گیری شده، اشاره کرد که ممکن است آزمون آماری توان کافی برای دسترسی به تفاوت را نداشته باشد. به طور خلاصه، یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد رزوواستاتین از طریق تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کبد باعث کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن و آسیب

رویشی رادیکال‌های آزاد سبب کاهش تجمع این رادیکال‌ها و آسیب اکسیداتیو در طی دیابت شده است. از طرفی در مطالعه حاضر استفاده از این دارو باعث تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کبد شد. زیرا رزوواستاتین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (به طور معنی‌دار)، میزان فعالیت آنزیم سوپراکساید دیسموتاز و مقدار گلوکاتایون بافت کبدی حیوانات دیابتی را (به طور معنی‌دار) افزایش داد. آنزیم سوپراکساید دیسموتاز باعث تبدیل آنیون سوپراکساید به رادیکال پراکسید هیدروژن می‌شود و در نهایت پراکسید هیدروژن توسط آنزیم‌های کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز تبدیل به آب می‌شود.^{۴۰} در این میان، گلوکاتایون هم یک کوفاکتور کلیدی برای عملکرد آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز به شمار می‌رود که در کبد حیوانات دیابتی درمان شده با رزوواستاتین افزایش پیدا کرده بود. این نتایج نشان‌دهنده تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت کبد در حین دیابت توسط رزوواستاتین است که سبب کاهش میزان آسیب اکسیداتیو و تغییرات آسیب شناختی بافت کبد در حیوانات دیابتی درمان شده با رزوواستاتین شد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر میزان NOx بافت کبد، که شاخصی از میزان تولید نیتریک اکساید است، طی دیابت کاهش پیدا کرد. دیابت کنترل نشده از طریق فعال‌سازی پروتئین کیناز C-، میزان نیتریک اکساید بافتی، که یک ماده گشادکننده عروقی است، را کاهش داده و باعث انقباض عروقی و کاهش جریان خون بافتی می‌شود.^{۴۱} گزارش شده است میزان پاسخ اتساعی عروق از طریق نیتریک اکساید در افراد دارای دیابت کنترل نشده، کاهش می‌یابد.^{۴۲} دلایل متعدد دیگری نیز می‌توانند باعث کاهش تولید نیتریک اکساید در طی دیابت شوند که در این بین می‌توان به کاهش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی به دلیل کاهش انسولین، افزایش میزان مهارکننده درون‌زاد نیتریک اکساید حین دیابت، و در نهایت کاهش فراهم‌زیستی نیتریک اکساید به دلیل واکنش با رادیکال‌های آزاد اکسیژن اشاره کرد.^{۴۳،۴۴} در طرف مقابل، نتایج برخی محققین نشان می‌دهد میزان تولید نیتریک اکساید در برخی از بافت‌های بدن از جمله بافت کبد افزایش پیدا می‌کند. در تحقیقی مشخص شد افزایش تولید نیتریک اکساید به دلیل هیپرگلیسمی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین با میزان آسیب‌های ایجاد شده به بافت کبد مرتبط است.^{۴۵} در تحقیقی دیگر، ایجاد دیابت با استرپتوزوتوسین باعث افزایش تولید نیتریک اکساید در

طی دیابت بتواند از آسیب‌های اکسیداتیو و تغییرات آسیب-شناختی بافت کبد جلوگیری کند.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله از گروه فیزیولوژی و فیزیک پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله که مقدمات لازم جهت انجام تحقیق حاضر را فراهم کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

اکسیداتیو در بافت کبد در شرایط دیابت کنترل نشده می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد رزواستاتین مانع آسیب در بافت کبد دیابتی از طریق افزایش تولید نیتریک اکساید شود. بر این اساس، استفاده از رزواستاتین ممکن است در

References

1. Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 1773-82.
2. Kanikarla-Marie P, Jain SK. Role of Hyperketonemia in Inducing Oxidative Stress and Cellular Damage in Cultured Hepatocytes and Type 1 Diabetic Rat Liver. *Cell Physiol Biochem* 2015; 37: 2160-70.
3. Vadivelan R, Umasankar P, Mandal D, Shanish A, Dhanabal S, Elango K. Oxidative stress induced diabetic nephropathy. *Research J Pharmacology and Pharmacodynamics* 2010; 2: 321-3.
4. Kashiwara N, Haruna Y, Kondeti V, Kanwar Y. Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Curr Med Chem* 2010; 17: 4256.
5. Cusi K, Sanyal AJ, Zhang S, Hartman ML, Bue-Valleskey JM, Hoogwerf BJ, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) prevalence and its metabolic associations in patients with type 1 diabetes and type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2017.
6. Lucchesi AN, Freitas NT, Cassettari LL, Marques SF, Spadella CT. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease. *Acta Cir Bras* 2013; 28: 502-8.
7. Raza H, John A, Howarth FC. Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in zucker diabetic rat liver and brain. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35: 1241-51.
8. Liu X, Zhang J, Ming Y, Chen X, Zeng M, Mao Y. The aggravation of mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease accompanied with type 2 diabetes mellitus. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50: 1152-9.
9. Miersch S, Sliskovic I, Raturi A, Mutus B. Antioxidant and antiplatelet effects of rosuvastatin in a hamster model of prediabetes. *Free Radical Bio Med* 2007; 42: 270-9.
10. Mohammadi MT, Amini R, Jahanbakhsh Z, Shekarf-oroush S. Effects of atorvastatin on the hypertension-induced oxidative stress in the rat brain. *Iran Biomed J* 2013; 17: 152-7.
11. Roan JN, Fang SY, Chang SW, Hsu CH, Huang CC, Chiou MH, et al. Rosuvastatin improves vascular function of arteriovenous fistula in a diabetic rat model. *J Vasc Surg* 2012; 56: 1381-9 e1.
12. Ping F, Wang X, Yang J, Zhou MC, Li W, Xu LL, et al. Rationale and Design of RNAFH Study: Effect of Rosuvastatin (10 mg/d) on Nonalcoholic Fatty Liver in Metabolic Syndrome Patients without Overt Diabetes Evaluated by 1H-Magnetic Resonance Spectroscopy. *Int J Endocrinol* 2016; 2016: 8454751.
13. Yokohama K, Fukunishi S, Ii M, Nakamura K, Ohama H, Tsuchimoto Y, et al. Rosuvastatin as a potential preventive drug for the development of hepatocellular carcinoma associated with non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Int J Mol Med* 2016; 38: 1499-506.
14. Kargiotis K, Katsiki N, Athyros VG, Giouleme O, Patsiaoura K, Katsiki E, et al. Effect of rosuvastatin on non-alcoholic steatohepatitis in patients with metabolic syndrome and hypercholesterolaemia: a preliminary report. *Curr Vasc Pharmacol* 2014; 12: 505-11.
15. Riche DM, Fleming JW, Malinowski SS, Black CA, Miller KH, Wofford MR. Resistant nonalcoholic fatty liver disease amelioration with rosuvastatin and pioglitazone combination therapy in a patient with metabolic syndrome. *Ann Pharmacother* 2014; 48: 137-41.
16. Fang SY, Roan JN, Lin Y, Hsu CH, Chang SW, Huang CC, et al. Rosuvastatin Suppresses the Oxidative Response in the Venous Limb of an Arteriovenous Fistula and Enhances the Fistula Blood Flow in Diabetic Rats. *J Vasc Res* 2014; 51: 81-9.
17. Mohammadi MT, Pirmoradi L, Mesbah F, Safae A, Dehghani GA. Trophic actions of oral vanadium and improved glycemia on the pancreatic beta-cell ultrastructure of streptozotocin-induced diabetic rats. *JOP* 2014; 15: 591-6.
18. Pirmoradi L, Mohammadi MT, Safaei A, Mesbah F, Dehghani GA. Does the relief of glucose toxicity act as a mediator in proliferative actions of vanadium on pancreatic islet beta cells in streptozocin diabetic rats? *Iran Biomed J* 2014; 18: 173-80.
19. Darabi S, Mohammadi MT. Fullerene nanoparticles decrease ischaemia-induced brain injury and oedema through inhibition of oxidative damage and aquaporin-1 expression in ischaemic stroke. *Brain Inj* 2017; 1-9.
20. Vani JR, Mohammadi MT, Foroshani MS, Jafari M. Polyhydroxylated fullerene nanoparticles attenuate brain infarction and oxidative stress in rat model of ischemic stroke. *EXCLI J* 2016; 15: 378-90.
21. Arjmand Abbassi Y, Mohammadi MT, Sarami Foroshani M, Raouf Sarshoori J. Captopril and Valsartan May Improve Cognitive Function Through Potentiation of the Brain Antioxidant Defense System and Attenuation of Oxidative/Nitrosative Damage in STZ-Induced Dementia in Rat. *Adv Pharm Bull* 2016; 6: 531-9.
22. Rees MD, Kennett EC, Whitelock JM, Davies MJ. Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1973-2001.
23. Matough FA, Budin SB, Hamid ZA, Alwahaibi N, Mohamed J. The role of oxidative stress and antioxidants in diabetic complications. *Sultan Qaboos Univ Med J* 2012; 12: 5-18.
24. Sonoda N, Inoguchi T. Role of oxidative stress in pathogenesis of diabetic complications. *Nihon Rinsho* 2012; 70: 231-5.
25. Matsuda M, Tamura R, Kanno K, Segawa T, Kinoshita H, Nishimoto O, et al. Impact of dyslipidemic components of metabolic syndrome, adiponectin levels, and anti-diabetes medications on malondialdehyde-modified low-density lipoprotein levels in statin-treated diabetes

- patients with coronary artery disease. *Diabetol Metab Syndr* 2013 6; 5: 77.
26. Cederberg H, Stancakova A, Yaluri N, Modi S, Kuusisto J, Laakso M. Increased risk of diabetes with statin treatment is associated with impaired insulin sensitivity and insulin secretion: a 6 year follow-up study of the METSIM cohort. *Diabetologia* 2015; 58: 1109-17.
 27. Sattar NA, Ginsberg H, Ray K, Chapman MJ, Arca M, Averna M, et al. The use of statins in people at risk of developing diabetes mellitus: Evidence and guidance for clinical practice. *Atherosclerosis Suppl* 2014; 15: 1-15.
 28. Heeba GH, Hamza AA. Rosuvastatin ameliorates diabetes-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress, inflammatory and apoptotic pathways in male rats. *Life Sci* 2015; 141: 13-9.
 29. Tanaka Y, Tran POT, Harmon J, Robertson RP. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic β cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12363-8.
 30. Williams SB, Cusco JA, Roddy M-A, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 567-74.
 31. Thum T, Fraccarollo D, Schultheiss M, Froese S, Galuppo P, Widder JD, et al. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling impairs endothelial progenitor cell mobilization and function in diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 666-74.
 32. Chen N, Leng YP, Xu WJ, Luo JD, Chen MS, Xiong Y. Contribution of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase to hepatic mitochondrial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Physiol Biochem* 2011; 27: 341-52.
 33. Sokolovska J, Isajevs S, Rostoka E, Sjakste T, Trapina I, Osina K, et al. Changes in glucose transporter expression and nitric oxide production are associated with liver injury in diabetes. *Cell Biochem Funct* 2015; 33: 367-74.
 34. Leonova E, Sokolovska J, Boucher JL, Isajevs S, Rostoka E, Baumane L, et al. New 1,4-Dihydropyridines Down-regulate Nitric Oxide in Animals with Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus and Protect Deoxyribonucleic Acid against Peroxynitrite Action. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016; 119: 19-31.
 35. Ingaramo PI, Ronco MT, Frances DE, Monti JA, Pisani GB, Ceballos MP, et al. Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus. *Mol Immunol* 2011; 48: 1397-407.
 36. Li M, Nishimura H, Kusano KF, Qin G, Yoon YS, Wecker A, et al. Neuronal nitric oxide synthase mediates statin-induced restoration of vasa nervorum and reversal of diabetic neuropathy. *Circulation* 2005; 112: 93-102.
 37. Huang D, Wang FB, Guo M, Li S, Yan ML, Yu T, et al. Effect of combined treatment with rosuvastatin and protein kinase Cbeta2 inhibitor on angiogenesis following myocardial infarction in diabetic rats. *Int J Mol Med* 2015; 35: 829-38.

Original Article

Evaluation of the Protective Effects of Rosuvastatin Through the Antioxidant Capacity and Oxidative Damage of Liver Tissue in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Yazdanimehr S¹, Mohammadi MT²

¹Baqiyatallah Research Center for Gastroenterology and Liver Diseases (BRCGL), Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran, ²Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran

e-mail: Mohammadi.mohammadt@yahoo.com

Received: 23/07/2017 Accepted: 24/01/2018

Abstract

Introduction: Weakening of the liver antioxidant capacity and oxidative damage play a crucial role in the genesis of hepatocellular damage during diabetic states. Considering to the antioxidant property of rosuvastatin, the aim of present study was to investigate whether rosuvastatin improves antioxidant capacity and oxidative damage of liver tissue in diabetes. **Materials and Methods:** Twenty-four rats were randomly divided into four groups (n=6 each), normal, treated normal, diabetic and treated diabetic groups. Diabetes was induced in rats by an intravenous injection of streptozotocin (40 mg/kg). Treated rats received rosuvastatin (10 mg/kg) daily by a gavage tube for sixty days. At the end, blood samples were collected for measuring blood glucose, and liver tissue was removed to determine malondialdehyde, glutathione and NOx (nitrate and nitrite) contents as well as catalase and superoxide dismutase activities. **Results:** Induction of diabetes (blood glucose >300 mg/dL) significantly increased the malondialdehyde content ($4.00 \pm 0.44 \mu\text{Mol/L}$), compared with the normal group ($1.08 \pm 0.39 \mu\text{Mol/L}$), whereas rosuvastatin significantly decreased it ($2.42 \pm 0.56 \mu\text{Mol/L}$), without changing blood glucose levels. Diabetes decreased the activities of catalase and superoxide dismutase by 81 and 54%, respectively. Treatment with rosuvastatin increased the catalase activity (90%) and glutathione content (65%) in diabetic rats. Also, diabetes significantly decreased the NOx content ($15 \pm 1 \mu\text{Mol/L}$), compared to the normal group ($34 \pm 15 \mu\text{Mol/L}$), whereas rosuvastatin significantly increased it ($61 \pm 16 \mu\text{Mol/L}$). **Conclusion:** Our results indicate that rosuvastatin can increase the antioxidant capacity of diabetic liver, and treatment with rosuvastatin may hence improve the tissue and oxidative damages of the liver during diabetic states.

Keywords: Rosuvastatin, Diabetes Mellitus, Antioxidant capacity, Oxidative damage, Hyperglycemia