

مطالعه تاثیر حفاظتی نارینژنین بر آسیب پیش‌رس کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان

داریوش مهاجری^{۱*}، غفور موسوی^۲، رامین کفاشی الهی^۲، مهرداد نشاط قراملکی^۲

۱- استاد گروه پاتوبیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: daryoushmohajeri@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۴/۹/۲۹ پذیرش نهایی: ۹۵/۳/۵)

چکیده

دیابت ملیتوس اختلالی متابولیکی است که از شیوع بالایی در سراسر جهان برخوردار می‌باشد. نارسایی کبدی از عوارض عمده بیماری دیابت می‌باشد. داروهای بسیاری از سراسر جهان جهت مداوای افراد دیابتی توصیه شده‌اند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات محافظتی نارینژنین بر آسیب پیش‌رس کبدی در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان می‌باشد. تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار به طور تصادفی در ۴ گروه ۱۰تایی شامل: ۱- گروه شاهد سالم، ۲- گروه سالم تیمار با نارینژنین، ۳- گروه کنترل دیابتی و ۴- گروه دیابتی تیمار با نارینژنین تقسیم شدند. دیابت تجربی نیز با تزریق داخل صفاقی تک دز آلوکسان (۱۲۰ mg/kg) ایجاد گردید. موش‌های گروه‌های ۲ و ۴ نارینژنین را به میزان ۵۰ mg/kg از راه خوراکی به صورت گاواژ، روزانه و به مدت ۳ هفته دریافت کردند. به موش‌های گروه‌های شاهد متناظر (گروه‌های ۱ و ۳) نیز نرمال سالن با حجمی برابر تزریق شد. در پایان دوره آزمایش، شاخص‌های بیوشیمیایی عملکرد کبد در خون شامل آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپاراتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز و آلبومین، پروتئین تام و بیلی‌روبین تام و همچنین حاصل پراکسیداسیون لیپیدی (مالون‌دی‌آلدنید) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز در هموژنات بافت کبد موش‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین، آسیب‌شناسی بافتی جهت ارزیابی درجات مختلف آسیب کبد انجام شد. در موش‌های دیابتی، نارینژنین به طور معنی‌داری میزان آنزیم‌های شاخص آسیب کبد و بیلی‌روبین تام را کاهش و سطوح آلبومین و پروتئین تام سرم را افزایش داد. همچنین، نارینژنین به طور معنی‌داری میزان پراکسیداسیون لیپیدی را در موش‌های دیابتی کاهش و سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را در آنها افزایش داد. نتایج هیستوپاتولوژی کبد نیز با یافته‌های بیوشیمیایی در توافق بودند. نتایج بررسی حاضر نشان داد که نارینژنین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود از بروز آسیب‌های زود هنگام دیابتی کبد در موش‌های صحرایی جلوگیری می‌کند.

کلید واژه‌ها: نارینژنین، استرس اکسیداتیو، دیابت، آلوکسان، کبد، موش صحرایی.

مقدمه

دیابت است (Ceriello *et al.*, 1997; Kaneto *et al.*,)

(2007; Bulter *et al.*, 2000).

کبد، اندامی موثر در متابولیسم، حفظ و برقراری سطح گلوکز خون در محدوده طبیعی بوده و افزایش قند خون منجر به عدم تعادل در واکنش‌های اکسیداسیون-احیاء در درون هپاتوسیت‌ها می‌شود به این صورت که، هیپرگلیسمی از طریق افزایش تولید (advanced AGEs) glycation end products; باعث تسهیل در تولید رادیکال‌های آزاد (reactive oxygen species; ROS) از طریق اختلال در تولید زداينده‌های درونزاد رادیکال‌های آزاد مثل سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌گردد که به آسیب سلول منجر می‌شود.

با توجه به نقش رادیکال‌های آزاد در دیابت، یکی از عرصه‌های مورد تحقیق در درمان این بیماری، کاستن تولید رادیکال‌های آزاد است (Bulter *et al.*, 2000). در این راستا، اثر آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری و یا کاهش صدمات وارده از طریق رادیکال‌های آزاد در دیابت مورد بررسی قرار گرفته است (El-Bassiouni *et al.*,) (2005; Peerapatdit *et al.*, 2006). میزان پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از تنش‌های اکسیداتیو در سلول‌ها، توسط مکانیسم‌های تدافعی متنوعی شامل سیستم‌های زداينده آنزیماتیک و غیر آنزیماتیک رادیکال‌های آزاد که سطوح آنها در دیابت تغییر می‌یابد، کنترل می‌گردد (Wohaieb and Godin, 1987). بنابراین، ترکیباتی که بتوانند به هر طریق از آسیب‌های اکسیداتیو پیشگیری کنند، مقاومت سلول‌ها را در برابر آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد در بیماری دیابت افزایش می‌دهند. مدیریت و کنترل بیماری دیابت بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی، هنوز مورد چالش علم پزشکی می‌باشد و تقاضای بیماران

دیابت نوع ۲ به‌عنوان یک مسئله بهداشت جهانی همچنان رو به افزایش بوده و شایع‌ترین نوع دیابت به‌شمار می‌آید (Alberti and Zimmet, 1998). بیماری دیابت یک اختلال مزمن در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی و پروتئین بوده و باعث افزایش سطح قند خون می‌شود که در پی آن آسیب‌های جدی را در عروق و بافت‌های مختلف بدن سبب می‌گردد (Kesari *et al.*,) (2006). اگرچه پاتوژنز دیابت نوع ۲ به‌طور دقیق مشخص نشده است، لکن مدارک موجود اختلال در متابولیسم گلوکز و چربی را در این امر دخیل می‌دانند (McGarry, 1992). در بیماران دیابتی، هیپرگلیسمی باعث آزاد شدن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود. بنابراین، بیماری دیابت با تولید رادیکال‌های آزاد و از طریق افزایش استرس‌های اکسیداتیو باعث آسیب سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن می‌شود (Signorini *et al.*, 2002; Mc Coll *et al.*, 1997). پرواضح است که عوارض ناشی از دیابت توسط فاکتورهای متعددی ایجاد می‌گردد. بنابراین، این عوارض تنها از طریق کنترل هیپرگلیسمی و فشار خون قابل پیشگیری نیستند (Liu *et al.*, 2008). اگرچه در مراحل اولیه بیماری، آسیب بافت‌ها توسط هیپرگلیسمی القاء می‌شود، اما پیشرفت آسیب به ابقاء هیپرگلیسمی ارتباط ندارد (Vestra and Fioretto, 2003). از این‌رو، کنترل گلوکز خون به تنهایی برای به‌تعویق انداختن روند عوارض دیابت کافی نیست. شواهد زیادی حاکی از نقش استرس اکسیداتیو و به دنبال آن تولید رادیکال‌های آزاد در بیماران دیابتی و دخالت این عوامل در پاتولوژی

جذب روده‌ای خود را افزایش می‌دهد (Haidari *et al.*, 2009).

مطالعات نشان داده‌است که نارینژنین دارای اثرات ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و حفاظت از سیستم عصبی می‌باشد (Choi and Ahn, 2008; Nalini *et al.*, 2012; Lee and Kim, 2010; Miyake *et al.*, 2003). نارینژنین ترکیبی با سه گروه هیدروکسیل بوده و بنابراین نسبت به سایر فلاوانون‌ها توانایی و قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی داشته و قادر است آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را تحریک کند (Chiou and Xu, 2004; Pollard *et al.*, 2006). نارینژنین علاوه بر اثرات بالقوه آنتی‌اکسیدانی (Rahigude *et al.*, 2012)، دارای اثرات ضد التهابی (Hirai *et al.*, 2007) برجسته‌ای نیز می‌باشد.

با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی نارینژنین، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات حفاظتی این محصول گیاهی بر آسیب زودرس کبدی دیابت در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان انجام شد.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. در این مطالعه کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی بود.

برای انجام این مطالعه، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 20 ± 20 گرم، به طور تصادفی در ۴ گروه ۱۰ تایی شامل: ۱- گروه شاهد سالم، ۲- گروه سالم تیمار با نارینژنین، ۳- گروه کنترل دیابتی

دیابتی برای استفاده از محصولات طبیعی با خواص ضد دیابتی رو به افزایش است چرا که انسولین و داروهای کاهنده قند خون خوراکی دارای اثرات جانبی نامطلوب زیادی هستند (Kameswara Rao and Appa Rao, 2001). پیشرفت‌های قابل توجهی در زمینه کنترل دیابت نوع ۲ توسط داروهای صنعتی حاصل شده است، ولی تلاش برای یافتن عوامل طبیعی برای مقابله با این بیماری همچنان ادامه دارد. در سال‌های اخیر دستیابی به انواع جدید آنتی‌اکسیدان‌ها با منشأ گیاهی به طور جدی مورد توجه محققین بوده است (Srivastava *et al.*, 1993).

فلاونون‌ها ترکیبات پلی‌فنلی با خصوصیات فارماکولوژیک متعدد هستند و به عنوان زدااینده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند (Arul and Subramanian, 2013; Keser *et al.*, 2013). بر اساس تفاوت در ساختار مولکولی این ترکیبات، شش گروه عمده از فلاونون‌ها وجود دارند که شامل: فلاونول‌ها (flavonols)، فلاون‌ها (flavones)، فلاوانون‌ها (flavanones)، کاتچین‌ها (catechins)، آنتوسیانیدین‌ها (anthocyanidins) و ایزوفلاونون‌ها (isoflavones) هستند (Kinoshita *et al.*, 2006). نارینژنین (Naringenin)، ۷،۵،۴-تری‌هیدروکسی-تری-هیدروکسی فلاوانون (4,5,7-trihydroxyflavanone) فلاوانونی هست که به وفور در میوه خانواده مرکبات مثل پرتغال و نارنگی، گریپ فروت و همچنین گوجه فرنگی و گیلاس و کاکائو وجود دارد (Jain *et al.*, 2011; Kawaii *et al.*, 1999). به طور طبیعی، این فلاوانون به شکل گلیکوزید (glycoside) درآمده و

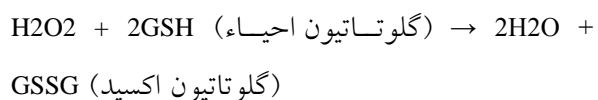
و ۴- گروه دیابتی تیمار با نارینژنین تقسیم شدند. شرایط تغذیه و نگهداری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای 21 ± 2 درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. جیره غذایی استاندارد و آب به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفت. یک هفته پس از عادت کردن موش‌ها به محیط جدید، برای دیابتی کردن موش‌ها محلول تازه تهیه شده آلوکسان با دز 120 mg/kg به‌صورت محلول در آب مقطر (۵٪)، بعد از ۱۵ ساعت پرهیز غذایی، به‌صورت داخل صفاقی به موش‌های گروه‌های ۳ و ۴ تزریق شد. موش‌های با قند خون بالای 240 mg/dl به عنوان دیابتی در نظر گرفته شد (Gupta et al., 2005). از کیت سنجش گلوکز، ساخت شرکت زیست شیمی ایران (Ziest chem) نیز برای سنجش قند خون استفاده شد. موش‌های گروه‌های ۲ و ۴ نارینژنین را که از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich Chemical Co., United Kingdom) به شکل پودر آماده در ویال‌های مخصوص خریداری شده بود، به‌طور تازه با حل کردن پودر در حلال دی‌متیل سولفوکسید، به میزان 50 mg/kg از راه خوراکی به صورت گاوآژ، روزانه و به مدت ۳ هفته دریافت کردند. میزان و روش مصرف نارینژنین بر اساس مطالعات آنادوری و همکاران در سال‌های ۲۰۱۲ و ۲۰۱۳ انتخاب شد (Annadurai et al., 2012; Annadurai et al., 2013). به موش‌های گروه‌های شاهد متناظر (گروه‌های ۱ و ۳) نیز نرمال سالین با حجمی برابر تزریق شد.

پس از ۳ هفته، جهت اندازه‌گیری برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرمی شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) (Reitman and Frankel, 1957)، آلکالین فسفاتاز (ALP) (Kind and King, 1954)، آلومین (Alb) و پروتئین تام (TP) (Lowry et al., 1951) و بیلی‌روبین تام (Malloy and Evelyn, 1937)، نمونه خون نیز از دم موش‌ها تهیه گردید. سرم نمونه‌های خون توسط سانتریفیوژ با سرعت 2500 دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد جدا شد. هم‌زمان همه موش‌ها با قطع سر (decapitation) به راحتی کشته شدند. کبد موش‌ها به سرعت خارج شده و قطعاتی از آنها جدا گردید و پس از شستشو در سالین بسیار سرد، توزین و هموژنات 10% در $1/15$ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با سرعت $7000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول شناور (supernatant) جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (lipid peroxidation; LPO) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD; dismutase)، کاتالاز (CAT; catalase)، گلوکاتینون پراکسیداز (GPX; glutathione peroxidase) و گلوکاتینون ردوکتاز (GR; glutathione reductase) مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه و میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA; malondialdehyde) و پروتئین شناور در محلول با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده کیت انجام شد. پراکسیداسیون چربی با اندازه‌گیری غلظت MDA سنجیده شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول مالون‌دی‌آلدئید در میلی‌گرم پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین عنوان گردید.

پس از ۳ هفته، جهت اندازه‌گیری برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرمی شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) (Reitman and Frankel, 1957)، آلکالین فسفاتاز (ALP) (Kind and King, 1954)، آلومین (Alb) و پروتئین تام (TP) (Lowry et al., 1951) و بیلی‌روبین تام (Malloy and Evelyn, 1937)، نمونه خون نیز از دم موش‌ها تهیه گردید. سرم نمونه‌های خون توسط سانتریفیوژ با سرعت 2500 دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد جدا شد. هم‌زمان همه موش‌ها با قطع سر (decapitation) به راحتی کشته شدند. کبد موش‌ها به سرعت خارج شده و قطعاتی از آنها جدا گردید و پس از شستشو در سالین بسیار سرد، توزین و هموژنات 10% در $1/15$ (w/v) کلرور پتاسیم تهیه شد. هموژنات با سرعت $7000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول شناور (supernatant) جهت سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (lipid peroxidation; LPO) و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD; dismutase)، کاتالاز (CAT; catalase)، گلوکاتینون پراکسیداز (GPX; glutathione peroxidase) و گلوکاتینون ردوکتاز (GR; glutathione reductase) مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد مطالعه و میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA; malondialdehyde) و پروتئین شناور در محلول با استفاده از کیت‌های تجاری در دسترس (Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute, Nanjing, China) و طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده کیت انجام شد. پراکسیداسیون چربی با اندازه‌گیری غلظت MDA سنجیده شد. مقدار MDA بافتی به صورت نانومول مالون‌دی‌آلدئید در میلی‌گرم پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت واحدهای قراردادی در میلی‌گرم پروتئین عنوان گردید.

مخلوط مورد سنجش متشکل از ۱/۹۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۷ و ۰/۰۵ مول)، ۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (۰/۰۱۹ مول) و ۰/۰۵ میلی‌لیتر PMS (۰/۱۰٪) در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر بود. تغییرات در جذب، در ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در نهایت نتیجه به شکل "فعالیت کاتالاز در دقیقه" محاسبه شد.

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز طبق روش روتراک و همکاران در سال ۱۹۷۳ بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (Rotruck *et al.*, 1973).



گلوتاتیون پراکسیداز، در هموژنات بافتی، گلوتاتیون را اکسیده کرده که به طور هم‌زمان پراکسید هیدروژن به آب احیاء می‌گردد. این واکنش پس از ۱۰ دقیقه توسط تری‌کلرواستیک اسید متوقف و گلوتاتیون باقی‌مانده توسط محلول (dithiobis nitrobenzoic acid) DTNB مجدداً فعال گردیده و منجر به تشکیل ترکیب رنگی می‌گردد که با اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. مخلوط واکنش‌گر متشکل از ۰/۲ میلی‌لیتر EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) ۰/۸ میلی-مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر آزید سدیم (sodium azide) ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۲/۵ میلی-مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر هموژنات بود که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف و لوله‌ها با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار ۳ میلی‌لیتر دی‌سدیم هیدروژن ۰/۸ میلی‌مولار و ۰/۱ میلی‌لیتر DTNB ۰/۰۴ درصد به محلول شناور افزوده شده و بلافاصله رنگ

پراکسیداسیون چربی در کبد با روش رنگ‌سنجی (colorimetrically) به وسیله اندازه‌گیری TBARS (Thiobarbituric acid reacting substances) طبق روش فراگا و همکاران در سال ۱۹۸۸ (Fraga *et al.*, 1988) انجام شد. به طور خلاصه، ۰/۱ میلی‌لیتر هموژنات بافتی با ۲ میلی‌لیتر رآژین TBA-trichloroacetic acid- Hcl reagent (۰/۳۷ TBA، ۰/۲۵ HCL، ۰/۱۵ TCA، به نسبت ۱:۱:۱) مخلوط و پس از ۱۵ دقیقه حمام بخار، خنک گردیده و در ۳۵۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. شدت جذب محلول شناور شفاف در ۵۳۵ نانومتر در مقابل بلانک اندازه‌گیری شد. مقادیر به صورت نانومول در ۱۰۰ گرم بافت بیان شد.

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز توسط روش نیشیکیمی در سال ۱۹۷۲ اندازه‌گیری شد (Nishikimi *et al.*, 1972). در حدود ۵ میکروگرم از پروتئین‌های تام هر یک از هموژنات‌های کبدی با بافر پیروفسفات سدیم، (phenazine methosulfate) PMT و (nitro-blue) NBT مخلوط گردید. واکنش با افزودن NADH (terazolium) آغاز گردید. مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه انکوبه و با افزودن ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال متوقف گردید. شدت جذب مخلوط رنگ‌زای تشکیل شده در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به صورت غلظت آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از تولید رنگ تا ۵۰ درصد در ۱ دقیقه، تحت شرایط مطالعه، تعیین گردید.

فعالیت کاتالاز توسط روش کلایبورن در سال ۱۹۸۵ براساس تجزیه پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ نانومتر، مورد سنجش قرار گرفت (Claiborne, 1985). به طور خلاصه،

$p < 0/05$ توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۷ مورد واکاوی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج تاثیر تیمار روزانه با نارینژنین با دز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۳ هفته بر میزان قند خون موش‌های مورد مطالعه در نمودار ۱ آورده شده است. نارینژنین اثر هیپوگلیسمیک معنی‌داری در موش‌های سالم ($p < 0/05$) و دیابتی ($p < 0/01$) بعد از ۳ هفته استفاده ایجاد کرد.

جدول ۱، تاثیر نارینژنین بر سطوح سرمی شاخص‌های آسیب کبدی را در موش‌های دیابتی نشان می‌دهد. مقادیر سرمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز و بیلی‌روبین در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه شاهد سالم افزایش یافت. این پارامترها در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین به‌طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه دیابتی کاهش نشان دادند. میزان آلبومین و پروتئین تام سرم در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه شاهد سالم کاهش یافت. این پارامترها در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه دیابتی افزایش نشان دادند.

جدول ۲، تاثیر آنتی‌اکسیدانی نارینژنین را در بافت کبد موش‌های دیابتی نشان می‌دهد. محتوای مالون‌دی‌آلدئید کبد در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه شاهد سالم افزایش یافت و در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه دیابتی

حاصله در ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به صورت میکرومول گلوتاتیون اکسید/دقیقه/میلی گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز با استفاده از روش مهندس همکاران در سال ۱۹۸۴ بر اساس واکنش ذیل مورد سنجش قرار گرفت (Mohandas et al., 1984).



در حضور گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون اکسیده، احیاء گردیده و هم‌زمان، NADPH به NADP^+ اکسیده می‌شود. فعالیت آنزیم در دمای اتاق توسط سنجش میزان ناپدید شدن NADPH/دقیقه در ۳۴۰ نانومتر، با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید.

برای آسیب‌شناسی بافتی، از کبد تمامی موش‌ها نمونه‌هایی اخذ و در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار شدند. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساز بافت و تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین تهیه شد (Lee and Luna, 1988). تغییرات هیستوپاتولوژی کبد به صورت تغییر چربی (fatty Change) هپاتوسیت‌ها بر اساس شدت ضایعه، از صفر تا ۳ (صفر: حالت طبیعی، ۱: استئاتوز خفیف، ۲: استئاتوز متوسط و ۳: استئاتوز شدید) رتبه‌بندی شد. کلیه درجه‌بندی‌ها با بزرگنمایی $\times 100$ و در ۵ میدان میکروسکوپی از هر برش، به‌طور تصادفی، انجام شد.

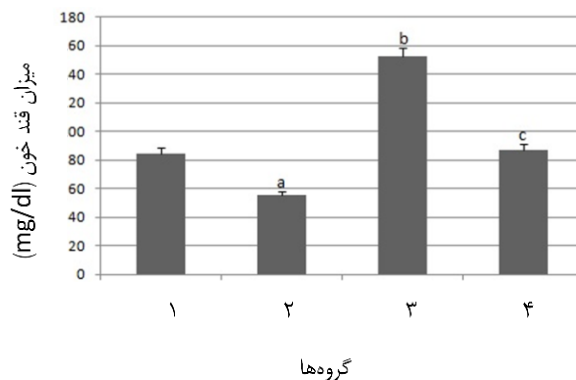
تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده کمی، به صورت $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در سطح معنی‌داری

مشاهده نشد (شکل ۱-ب). در بافت کبد موش-های گروه دیابتی تغییر چربی در ناحیه مرکزی لوبول‌های کبد مشاهده شد (شکل ۱-ج). در گروه دیابتی تیمار با نارینژین، نارینژین از بروز آسیب در بافت کبد جلوگیری کرد به طوری که، تغییر چربی قابل ملاحظه‌ای در هیپاتوسیت‌ها مشاهده نشد (شکل ۱-د). نتایج کمی مشاهدات ریزینی بافت کبد موش‌های مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است.

کاهش یافت. محتوای سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز کبد در گروه دیابتی به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. این پارامترها در گروه دیابتی تیمار با نارینژین به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) در مقایسه با گروه دیابتی افزایش نشان دادند.

در مشاهدات ریزینی، ساختار بافت کبد در گروه شاهد طبیعی بود (شکل ۱-الف). در گروه سالم تیمار با نارینژین نیز تغییر پاتولوژیک خاصی



نمودار ۱- مقایسه تاثیر نارینژین بر میزان قند خون در موش‌های صحرایی مورد مطالعه (mean±SEM).
a,b: در مقایسه با گروه ۱ (شاهد سالم)، c: در مقایسه با گروه ۳ (دیابتی) ($p < 0/05$).

جدول ۱- مقایسه تاثیر نارینژین بر میزان شاخص‌های سرمی آسیب کبد در موش‌های صحرایی مورد مطالعه (mean±SEM)

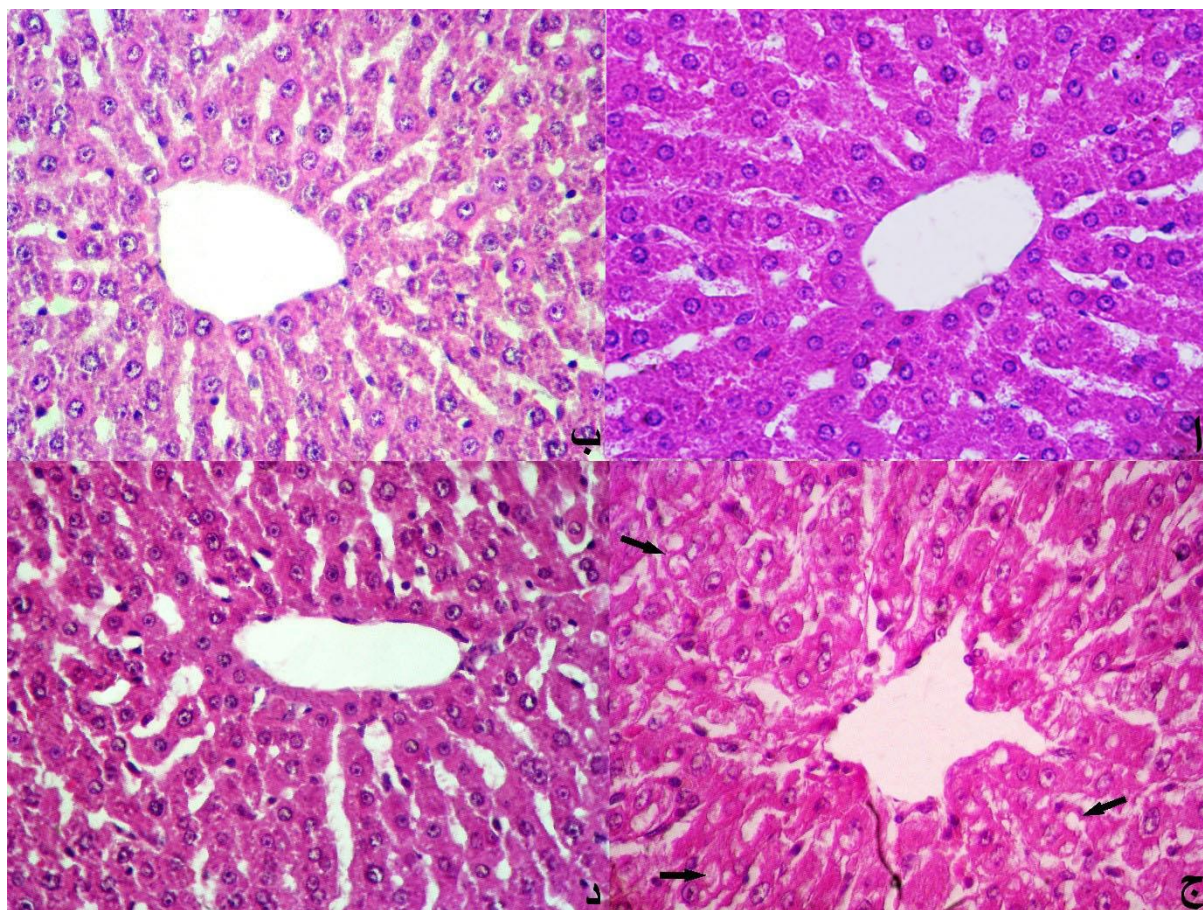
گروه‌ها	فراسنجه‌ها			
	آلانین آمینوترانسفراز آسپاراتات (U/L)	آمینوترانسفراز لاکتات دهیدروژناز (U/L)	بیلی‌روبین تام (mg/dl)	پروتئین تام (g/dl)
شاهد سالم	۵۵/۳۲±۳/۶۷	۷۳/۷۲±۲/۳۵	۱۹۳/۱۵±۸/۷۱	۴/۲۲±۰/۳۸
سالم تیمار با نارینژین	۵۳/۹۰±۳/۱۱	۷۱/۴۲±۳/۶۶	۱۹۶/۴۴±۱۰/۲۵	۴/۳۵±۰/۴۱
دیابتی	۶۸/۸۴±۴/۶۵ ^a	۹۵/۷۳±۴/۱۵ ^a	۲۷۱/۶۵±۹/۳۳ ^a	۵/۴۳±۰/۳۸ ^a
دیابتی تیمار با نارینژین	۵۹/۴۲±۳/۷۱ ^b	۸۲/۱۱±۴/۷۲ ^b	۲۲۵/۸۴±۸/۴۷ ^b	۶/۹۲±۰/۲۳ ^b

a: در مقایسه با گروه ۱ (شاهد سالم)، b: در مقایسه با گروه ۳ (دیابتی) ($p < 0/05$).

جدول ۲- مقایسه تاثیر نارینژنین بر میزان مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش‌های صحرایی مورد مطالعه (mean±SEM)

فراسنجه‌ها					گروه‌ها
مالون‌دی‌آلدئید (nmol/g protein)	سوپراکسید دیسموتاز (U/mg protein)	کاتالاز (U/mg protein)	گلوکاتیون پراکسیداز (U/mg protein)	گلوکاتیون ردوکتاز (U/mg protein)	
۳/۳۹±۰/۱۴	۱۳/۶۴±۰/۴۸	۶۴/۱۱±۳/۱۸	۲۰/۸۴±۱/۲	۱۲۰/۳۷±۴/۸۵	شاهد
۳/۲۵±۰/۱۸	۱۳/۸۵±۰/۶۷	۶۵/۷۳±۲/۱۵	۲۲/۱۴±۱/۶	۱۲۷/۱۴±۳/۷۶	سالم تیمار با نارینژنین
۵/۱۹±۰/۲۴ ^a	۸/۹۱±۰/۷۰ ^a	۵۳/۷۴±۱/۴۴ ^a	۱۷/۳۳±۱/۴ ^a	۱۰۴/۲۶±۲/۵۱ ^a	دیابتی
۴/۲۹±۰/۳۱ ^b	۱۱/۲۵±۰/۴۲ ^b	۶۰/۱۲±۱/۱۲ ^b	۱۹/۸۵±۱/۳ ^b	۱۱۹/۴۵±۳/۱۷ ^b	دیابتی تیمار با نارینژنین

a: در مقایسه با گروه ۱ (شاهد سالم)، b: در مقایسه با گروه ۳ (دیابتی) ($p < 0.05$).



شکل ۱- نمای ریزبینی از کبد موش‌های صحرایی مورد مطالعه (هماتوکسیلین-اُئوزین، بزرگنمایی $\times 400$). در نمای ریزبینی ساختار بافت کبد در گروه شاهد سالم طبیعی می‌باشد (الف). در گروه سالم تیمار با نارینژنین نیز تغییر پاتولوژیک خاصی مشاهده نمی‌شود (ب). در گروه دیابتی در بافت کبد موش‌های دیابتی تغییر چربی (پیکان‌ها) در ناحیه مرکز لوبولی مشاهده می‌شود (ج). در گروه دیابتی تیمار با نارینژنین، نارینژنین از بروز تغییرات پاتولوژیک جلوگیری کرده و تغییر چربی قابل ملاحظه‌ای در هیپاتوسیت‌ها مشاهده نمی‌شود (د).

جدول ۳- تاثیر نارینژین بر آسیب کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان (mean±SEM)

گروه	تیمار	درجه آسیب یافت	نتیجه آزمون کروسکال والیس
۱	شاهد	۰/۰±۰/۰	p<۰/۰۰۱
۲	سالم تیمار با نارینژین	۰/۰±۰/۰	
۳	دیابتی	۲/۵۶±۰/۱۸ ^a	
۴	دیابتی تیمار با نارینژین	۰/۵۳±۰/۲۱ ^b	

- بدون آسیب، ۱- آسیب حداقل، ۲- آسیب ملایم، ۳- آسیب متوسط، ۴- آسیب شدید

a در مقایسه با گروه ۱ (شاهد)، b در مقایسه با گروه ۳ (دیابتی)

بحث و نتیجه گیری

این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود. افزایش سطح اسپاراتات آمینوترانسفراز در سرم، آسیب کبد نظیر هپاتیت‌های ویروسی، انفارکتوس قلبی و صدمات عضلانی را نشان می‌دهد. آلانین آمینوترانسفراز که تبدیل آلانین را به پیرووات و گلوتامات کاتالیز می‌کند، برای کبد اختصاصی‌تر بوده و پارامتر مناسب‌تری برای تشخیص آسیب کبد می‌باشد. سطوح افزایش یافته آنزیم‌های سرمی فوق حاکی از نشت سلولی بوده و نشانگر آسیب ساختار و اختلال عملکرد غشاءهای سلولی در کبد می‌باشد (Drotman and Lawhan, 1978). از سوی دیگر، سطح سرمی آلکالین فسفاتاز، بیلی‌روبین، آلومین و پروتئین تام با عملکرد سلول‌های کبدی در ارتباط می‌باشد. افزایش سطح سرمی آلکالین فسفاتاز به دلیل افزایش تولید در حضور فشار فزاینده صفراوی می‌باشد (Muriel et al., 1992). بازگشت سطوح افزایش یافته آنزیم‌های سرمی فوق به حالت طبیعی با مصرف نارینژین در موش‌های دیابتی، می‌تواند در اثر ممانعت از نشت آنزیم‌های داخل

در این مطالعه مصرف خوراکی نارینژین به میزان ۵۰ mg/kg و به مدت ۳ هفته باعث کاهش قند خون در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی شده توسط آلوکسان گردید. نتایج بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی نیز حاکی از آسیب بافت کبد در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط آلوکسان بود طوری‌که، در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان افزایش معنی‌دار سطوح آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، اسپاراتات آمینوترانسفراز، و آلکالین فسفاتاز و بیلی‌روبین و کاهش معنی‌دار آلومین سرم در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. نتایج بررسی حاضر نشان می‌دهد که مصرف نارینژین، پارامترهای شاخص آسیب کبدی را تا حد قابل قبولی بهبود می‌بخشد. در ارزیابی آسیب کبد، سنجش سطوح آنزیم‌هایی نظیر آلانین آمینوترانسفراز، اسپاراتات آمینوترانسفراز، و آلکالین فسفاتاز به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقوع نکروز یا آسیب غشاء سلول باعث رها شدن

سلولی به دلیل برقراری تمامیت و پایداری سلامت غشاء سلول و یا نوزایش سلول‌های آسیب دیده کبد باشد (Thabrew and Joice, 1987). کنترل موثر سطوح آلکالین فسفاتاز، بیلی‌روبین و آلبومین، بهبود زودهنگام مکانیسم‌های عملکردی و ترشحی سلول‌های کبدی را نشان می‌دهد. در این بررسی، تغییرات چربی در نواحی مرکز لوبولی در کبد موش‌های دیابتی مشاهده گردید. با تجویز نارینژنین به موش‌های دیابتی، تغییر پاتولوژیکی در بافت کبد مشاهده نشد که این خود اثرات محافظتی نارینژنین را در مقابل عوارض کبدی دیابت نشان می‌دهد. در هر صورت، یافته‌های آسیب‌شناسی این مطالعه با نتایج بیوشیمیایی به دست آمده همسو بوده و آن‌ها را مورد تأیید قرار می‌دهد.

در بررسی حاضر به نظر می‌رسد که رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و همچنین اسیدهای چرب غیراشباع توری داخل سیتوپلاسمی گردیده است که منجر به تشکیل پراکسیدهای لیپیدی (مالون‌دی‌آلدئید) و از بین رفتن تمامیت غشاء سلول و در نهایت آسیب کبد شده است. افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در موش‌های دیابتی، نشان‌دهنده افزایش واکنش‌های پراکسیداسیونی است که به ضعف مکانیسم‌های تدافعی آنتی‌اکسیدانی نیز منجر گردیده و بدین ترتیب ممانعت از تولید مفرط رادیکال‌های آزاد هم مقدور نخواهد بود (Naik, 2003). به عبارتی دیگر، افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید در کبد حاکی از

افزایش پراکسیداسیون لیپیدی است که منجر به آسیب بافت کبد و همچنین ناتوانی مکانیسم‌های تدافعی آنتی‌اکسیدانی در ممانعت از تولید بی‌رویه رادیکال‌های آزاد می‌گردد.

سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلووتاتیون پراکسیداز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که یک سیستم تدافعی را علیه گونه‌های فعال اکسیژن تشکیل داده‌اند (Lil et al., 1988). کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شاخصی حساس در مورد آسیب سلول‌های کبدی می‌باشد. این آنزیم یکی از مهم‌ترین عوامل در سیستم تدافعی آنتی‌اکسیدانی آنزیماتیک می‌باشد. سوپراکسید دیسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن مورد پاک‌سازی قرار داده و بدین ترتیب اثرات سمی آن را کاهش می‌دهد (Curtis et al., 1972). در بررسی حاضر، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش‌های دیابتی به دلیل تشکیل فراوان آنیون‌های سوپراکسید، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین فعالیت آنزیم‌های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز در این موش‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به نظر می‌رسد که غیرفعال شدن سوپراکسید دیسموتاز توسط آنیون‌های افزایش‌یافته سوپراکسید، منجر به غیرفعال شدن آنزیم‌های کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز می‌شود. در این مطالعه، مصرف نارینژنین مانع از کاهش سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز شده است که این اثر ممکن

گردد که منجر به دسترسی گلوکوتایون ردوکتاز به سوبسترا خواهد شد که بدین ترتیب فعالیت گلوکوتایون ردوکتاز کاهش می‌یابد. مصرف نارینژین در موش‌های دیابتی فعالیت گلوکوتایون ردوکتاز را مجدداً برقرار کرده که مصرف گلوکوتایون اکسید را جهت تشکیل گلوکوتایون احیاء و افزایش سم‌زدایی متابولیت‌های فعال توسط کونژوگاسیون با گلوکوتایون احیاء برقرار می‌کند.

نتایج بررسی حاضر اثرات مفید نارینژین را در مقابل عوارض کبدی دیابت نشان می‌دهد. بنابراین، نارینژین می‌تواند پس از انجام کارآزمایی‌های شاهددار اتفاقی و حصول نتایج مثبت، به‌عنوان یک داروی با منشأ گیاهی جهت پیشگیری از آسیب‌های کبدی ناشی از استرس اکسیداتیو در بیماری دیابت، در مورد انسان نیز توصیه گردد. تعیین تاثیر دزهای مختلف نارینژین و شناخت دقیق، مکان و مکانیسم یا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی مؤثر در عملکرد فرماکولوژیکی آن نیاز به مطالعات آتی دارد.

است به‌دلیل پاک‌سازی رادیکال‌ها توسط نارینژین باشد که منجر به حفظ و بقاء این آنزیم‌ها شده است.

کاتالاز آنزیم آنتی‌اکسیدانی است که در بافت‌های حیوانی به‌طور گسترده منتشر شده و دارای بیشترین فعالیت در کبد و گلبول‌های قرمز می‌باشد. کاتالاز پراکسید هیدروژن را تجزیه کرده و بافت‌ها را از رادیکال‌های بسیار فعال هیدروکسیل محافظت می‌کند (Chance *et al.*, 1952). بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است منجر به بروز برخی اثرات مخرب ناشی از رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد.

گلوکوتایون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی کبدی است که در کاهش گلوکوتایون اکسید، به‌عنوان محصول نهایی فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز علیه گلوکوتایون احیاء، دخالت دارد (Suresh and Vandana, 2008). متعاقب القاء دیابت کاهش قابل توجهی در میزان گلوکوتایون پراکسیداز حاصل می‌-

منابع

- Alberti, K.G.M.M. and Zimmet, P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetes Medicine*, 13: 539-553.
- Annadurai, T., Muralidharan, A.R., Joseph, T., Hsu, M.J., Thomas, P.A. and Geraldine, P. (2012). Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68(3): 307-318.
- Annadurai, T., Thomas, P.A. and Geraldine, P. (2013). Ameliorative effect of naringenin on hyperglycemia-mediated inflammation in hepatic and pancreatic tissues of Wistar rats with

- streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetes mellitus. *Free Radical Research*, 47(10): 793-803.
- Arul, D. and Subramanian, P. (2013). Inhibitory effect of naringenin (citrus flavonone) on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434: 203-209.
 - Bulter, R., Morris, A.D., Belch, J.J.E., Hill, A. and Struthers, A.D. (2000). Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetes with mild hypertension. *Hypertension*, 35: 746-751.
 - Ceriello, A., Motz, E., Cavarape, A., Lizzio, S., Russo, A., Quatararo, A. and Giugliano, D. (1997). Hyperglycemia counterbalances the antihypertensive effect of glutathione in diabetes patients: evidence linking hypertension and glycemia through the oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 11: 250-255.
 - Chance, B., Greenstein, D.S. and Roughton, R.J.W. (1952). The mechanism of catalase action. 1. Steady-state analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 37(2): 301-321.
 - Chiou, G.C.Y. and Xu, X. (2004). Effects of some natural flavonoids on retinal function recovery after ischemic insult in the rat. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 20(2): 107-113.
 - Choi, E.J. and Ahn, W. S. (2008). Neuroprotective effects of chronic hesperetin administration in mice. *Archives of Pharmacological Research*, 31(11): 1457-1462.
 - Claiborne, A. (1985). Catalase activity. In: Boca Raton FL, editor. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research*. Florida: CRC Press, Boca Raton, pp: 283-284.
 - Curtis, S.J., Mortiz, M. and Sondgrass, P.J. (1972). Serum enzyme derived from liver cell fraction and the response of carbon tetrachloride intoxication in rats. *Gastroenterology*, 62(1): 84-92.
 - Drotman, R. and Lawhan, G. (1978). Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. *Drug and Chemical Toxicology*, 1(2): 163-171.
 - El-Bassiouni, E.A., Helmy, M.H., Abou Rawash, N., El-Zoghby, S.M., Kamel, M.A. and Abou Rayah, A.N. (2005). Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defense. *British Journal of Biomedical Science*, 62: 71-76.
 - Fraga, C.G., Leibowitz, B.E. and Toppel, A.L. (1988). Lipid peroxidation measured as TBARS in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radical Biology and Medicine*, 4: 155-161.
 - Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V. and Watal, G. (2005). Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(1): 75-81.
 - Haidari, F., Keshavarz, S.A., Rashidi, M.R. and Shahi, M.M. (2009). Orange juice and hesperetin supplementation to hyperuricemic rats alter oxidative stress markers and xanthine oxidoreductase activity. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 45(3): 285-291.
 - Hirai, S., Kim, Y.I., Goto, T., Kang, M.S., Yoshimura, M., Obata, A., *et al.* (2007). Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Life Science Journal*, 81: 1272-1279.
 - Jain, A., Yadav, A., Bozhkov, A.I., Padalko, V.I. and Flora, S.J. (2011). Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 607-614.
 - Kameswara Rao, B. and Appa Rao, C.H. (2001). Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *alternifolium* (Wt.) Walp. Seed extracts in normal and diabetic rats. *Phytomedicine*, 8: 88-93.
 - Kaneto, H., Katakami, N., Kawamori, D., Miyatsoka, T., Sakamoto, K., Matsuoka, T.A., *et al.* (2007). Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal*, 9: 355-366.
 - Kawaii, S., Tomono, Y., Katase, E., Ogawa, F. and Yano M. (1999). Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9): 3565-3571.

- Kesari, A.N., Gupta, R.K., Singh, S.K., Diwakar, S. and Watal, G. (2006). Hypoglycemic and antihyperglycemic activity of *Aegle marmelos* seed extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(3): 374-379.
- Keser, S., Celik, S. and Turkoglu, S. (2013). Total phenolic contents and free-radical scavenging activities of grape (*Vitis vinifera* L.) and grape products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64: 210-216.
- Kind, P.R. and King, E.J. (1954). Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolyzed phenol with antipyrin. *Journal of Clinical Pathology*, 7: 322-326.
- Kinoshita, T., Lepp, Z., Kawai, Y., Terao, J. and Chuman, H. (2006). An integrated database of flavonoids. *BioFactors*, 26(3): 179-188.
- Lee, J. and Kim, G. (2010). Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *Journal of Food Science*, 75(7): H212-H217.
- Lee, G., Luna, H.T. (1988). *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology*. 3rd ed., New York: Mc Graw-Hill Book Company, pp: 32-107.
- Lil, J.L., Stantman, F.W. and Lardy, H.A. (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 263(1): 150-160.
- Liu, H.R., Tang, X.Y., Dai, D.Z. and Dai, Y. (2008). Ethanol extracts of *Rehmannia complex* (Di Huang) containing no *Corni fructus* improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(3): 466-472.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Malloy, H.T. and Evelyn, K.A. (1937). The determination of bilirubin level with the photoelectric colorimeter. *Journal of Biological Chemistry*, 119: 481-484.
- Mc Coll, A.J., Kong, C., Collins, J., Ellkeles, R. and Richmond, W. (1997). Total antioxidant status, protein glycation, lipid hydroperoxides in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Biochemistry Society Transplantation*, 25: 132-137.
- McGarry, J.D. (1992). What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science*, 258: 766-770.
- Miyake, Y., Minato, K., Fukumoto, S., Yamamoto, K., Oya-Ito, T., Kawakishi, S., *et al.* (2003). New potent antioxidative hydroxyflavanones produced with *Aspergillus saitoi* from flavanone glycoside in citrus fruit. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67(7): 1443-1450.
- Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S.L. and Tiller, D.G. (1984). Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Research*, 44: 5086-5091.
- Muriel, P., Garcipiana, T., Perez-Advarez, V. and Mourelle, M. (1992). Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *Journal of Applied Toxicology*, 12(6): 439-342.
- Naik, S.R. (2003). Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian Drugs*; 40(9): 501-512.
- Nalini, N., Aranganathan, S. and Kabalimurthy, J. (2012). Chemopreventive efficacy of hesperetin (citrus flavonone) against 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22: 397-408.
- Nishikimi, M., Rao, N.A. and Yagi, K. (1972). The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulphate and molecular oxygen. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 46: 849-854.

- Peerapatdit, T., Patchanas, N., Likidlilid, A., Poldee, S. and Sriratanasathavorn, C. (2006). Plasma lipid peroxidation and antioxidant nutrients in type 2 diabetic patient. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 89: Suppl 5: S147-155.
- Pollard, S.E., Whiteman, M. and Spencer, J.P.E. (2006). Modulation of peroxynitrite-induced fibroblast injury by hesperetin: a role for intracellular scavenging and modulation of ERK signalling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 347(4): 916-923.
- Rahigude, A., Bhutada, P., Kaulaskar, S., Aswar, M. and Otari K. (2012). Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience*, 226: 62-72.
- Reitman, S. and Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *American Journal of Clinical Pathology*, 28: 56-63.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 588-590.
- Signorini, A.M., Fondelli, C., Renzoni, E., Puccetti, C., Gragnoli, G. and Giorgi, G. (2002). Antioxidant effect of gliclazide, glibenclamide and metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Current Therapeutic Research*, 63: 411-420.
- Srivastava, Y., Bhat, H.V., Verma, Y. and Venkaidh, K. (1993). Antidiabetic and adaptogenic properties of *Momordica charantia* extract: an experimental and clinical evaluation. *Phytotherapy Research*, 7: 285-288.
- Suresh, R.N. and Vandana, S.P. (2008). Hepatoprotective effect of Ginkgoselect Phytosome® in rifampicin induced liver injury in rats: Evidence of antioxidant activity. *Fititerapia*, 79(6): 439-445.
- Thabrew, M. and Joice P. (1987). A comparative study of the efficacy of *Pavetta indica* and *Osbeckia octanda* in the treatment of liver dysfunction. *Planta Medica*, 53(3): 239-241.
- Vestra, M.D. and Fioretto, P. (2003). Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. *International Congress Series*, 1253: 163-169.
- Wohaieb, S.A. and Godin, D.V. (1987). Alterations in free radical tissue defense mechanism in STZ induced diabetes in rat, effects of insulin treatment. *Diabetes*, 36: 1014-1018.

Study on protective effect of Naringenin (Citrus flavonone) on incipient diabetic hepatopathy in alloxan-induced diabetic rats

Mohajeri, D.^{*1}, Mousavi, Gh.², Kaffashi Elahi, R.², Neshat Gharamaleki, M.²

1-Professor, Department of Pathobiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

*Corresponding author's email: daryoushmohajeri@yahoo.com

(Received: //Accepted: //)

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder and its incidence is considered to be high all over the world. Hepatic insufficiency is one of the most important consequences in this disease. A multitude of drugs has been described for the treatment of diabetes throughout the world. The aim of the present study was to assess the protective effect of Naringenin on early liver injury in alloxan-induced diabetic rats. Forty male Wistar rats were randomly assigned into 4 different groups of 10 rats each, including healthy control rats, normal healthy rats receiving Naringenin (50 mg/kg), diabetic rats and diabetic rats receiving Naringenin (50 mg/kg). Diabetes was induced with a single injection of alloxan (120 mg/kg i.p.). Naringenin groups received the drug daily for 3 weeks through gavage. At the end of the experiment, levels of liver function marker enzymes AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase) and ALP (Alkaline Phosphatase), TB (Total Bilirubin), Alb (Albumin) and TP (Total Proteins) were assessed in serum. Product of lipid peroxidation (Malondialdehyde; MDA), activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) were also assayed in liver homogenate to evaluate antioxidant activity. Moreover, histopathological observations were made to assess the degree of hepatic injury. In alloxanized diabetic rats, Naringenin significantly decreased the levels of serum biomarkers of hepatic injury and TB, and elevated the levels of Alb and TP. Furthermore, Naringenin significantly decreased the lipid peroxidation and elevated the levels of antioxidant enzymes in these rats. Histopathological changes were in agreement with biochemical findings. The findings of this study indicated that Naringenin due to its antioxidant activities protects rats liver from early diabetic hepatopathy.

Key words: Naringenin, Oxidative stress, Diabetes, Alloxan, Liver, Rat.