

## **Effect of rosmarinic acid on inhibition of mesangial expansion in uninephrectomized diabetic rats**

Tavafi M(Ph.D)<sup>1\*</sup>, Tamjidipour A(M.Sc)<sup>1</sup>, Khalatbari A(Ph.D)<sup>1</sup>

1- Department of Anatomy, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

Received: 24 Oct 2010 , Accepted: 29 Dec 2010

---

### **Abstract**

**Background:** Diabetic nephropathy is one of the most common causes of end stage renal diseases. The aim of this study was to evaluate the antioxidant, anti-diabetic, and anti-inflammatory roles of rosmarinic acid in inhibition of diabetic nephropathy.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 40 male rats were uninephrectomized from the left flank. The rats were randomly divided into four groups of ten: Group1 (control), group 2 (control) including untreated diabetic rats, and groups 3 and 4 (treatment groups) that received rosmarinic acid 100 and 200 mg/kg, respectively. Diabetes was induced in groups 2, 3, and 4 by subcutaneous injection of alloxan. After 8 weeks, serum malondialdehyde was measured. Kidney paraffin sections were prepared and stained by periodic acid Schiff method. Glomerular, intraglomerular mesangial, and glomerular capillary volumes were estimated by stereological methods. Data were analyzed by SPSS 13 software and Man-Whitney nonparametric test.

**Results:** The level of serum malondialdehyde in treatment groups was maintained at the level of control group. Glomerular hypertrophy, mesangial expansion, and reduction of glomerular capillary volume in groups treated by rosmarinic acid were significantly inhibited compared with the untreated diabetic group, but the levels of these variables were significantly different from that of the control group.

**Conclusion:** Rosmarinic acid significantly ameliorates glomerular hypertrophy, mesangial expansion, and glomerular capillary volume in diabetic rats.

**Keywords:** Diabetic nephropathy, Glomerulosclerosis, Malondialdehyde, Rosmarinic acid

\*Corresponding author:

Address: Department of Anatomy, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran  
Email: mtavafi@yahoo.com

## تاثیر رزمارینیک اسید بر مهار گسترش مزانژال در رت‌های دیابتی: نفرکتومی یک طرفه

دکتر مجید طوافی<sup>۱\*</sup>، احمد تمجیدی پور<sup>۲</sup>، دکتر علیرضا خلعتبری<sup>۳</sup>

۱- دانشیار، دکترای تخصصی بافت شناسی، گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، لرستان، ایران

۲- مربی، گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، لرستان، ایران

۳- استادیار، دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، لرستان، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۸

### چکیده

**زمینه و هدف:** نفروپاتی دیابتی یکی از شایع‌ترین علل رسیدن به مرحله نهایی بیماری کلیوی است. هدف این پژوهش بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌دیابتی و ضد التهابی رزمارینیک اسید در مهار نفروپاتی دیابتی می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۴۰ راس رت نر مورد جراحی نفرکتومی چپ قرار گرفتند. رت‌ها به طور تصادفی به چهار گروه (هر گروه ۱۰ رت) تقسیم شدند. گروه یک کنترل، گروه دوم دیابتی بدون درمان، گروه‌های سوم و چهارم گروه‌های درمانی با رزمارینیک اسید به ترتیب با دوز درمانی ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انتخاب شدند. در گروه‌های دوم، سوم و چهارم با تزریق زیر جلدی آلوکسان دیابت‌قاء گردید. بعد از ۸ هفته درمان، مالون دی‌آلدهید سرمی اندازه‌گیری شد. برش‌های پارافینی از کلیه تهیه و به روش پاس رنگ آمیزی گردید. حجم گلومرول، حجم مزانژال داخل گلومرولی و حجم مویرگ گلومرولی با روش‌های استریولوژیک برآورد گردید. اطلاعات به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ و تست ناپارامتری من‌ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** سطح سرمی مالون دی‌آلدهید در گروه‌های تحت درمان با رزمارینیک اسید به طور معنی‌داری در سطح گروه کنترل حفظ شده بود. هیپرتروفی گلومرولی، گسترش مزانژال و کاهش مویرگ‌های گلومرولی در گروه‌های درمانی با رزمارینیک اسید به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه دیابتی بدون درمان بهبود یافته بود، ولی با سطح این متغیرها در گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشت.

**نتیجه‌گیری:** رزمارینیک اسید می‌تواند هیپرتروفی گلومرولی، گسترش مزانژال و کاهش حجم مویرگ گلومرولی را در رت‌های دیابتی بهبود بخشد.

**واژگان کلیدی:** اسکلرز گلومرولی، رزمارینیک اسید، مالون دی‌آلدهید، نفروپاتی دیابتی

\*نویسنده مسئول: خرم آباد. دانشگاه علوم پزشکی لرستان، گروه علوم تشریح

Email: mtavafi@yahoo.com

## مقدمه

نفروپاتی دیابتی علت شایع رسیدن به مرحله نهایی بیماری کلیوی (دیالیز و پیوند کلیه) است (۱). نفروپاتی دیابتی یک بیماری پیشرونده است که با تجمع ماتریکس خارج سلولی در مزانژوم و بافت بینابینی کلیه مشخص شده و به انسداد مویرگ‌های گلومرولی و نارسایی کلیوی منجر می‌گردد (۲). مکانیسم‌های زیادی در خصوص پاتوژنز نفروپاتی دیابتی تاکنون عنوان شده است، که شروع کننده تمامی این مکانیسم‌های آسیب زایی هیپرگلیسمی است. از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها عبارتند از: افزایش فعالیت آنژیوتانسین ۲ (Angotensin = AgII) درون کلیوی که منجر به آسیب زایی در کلیه به ویژه در گلومرول‌ها می‌شود، ایجاد محصولات نهایی گلیکوزیله نوین (Advanced glycation end products = AGEs)، فعال شدن مسیر پلی اول یا مسیر هگزوکیناز، افزایش فعالیت آلدول ردوکتاز، فعال شدن پروتئین کیناز C (PKC)، افزایش فاکتور رشد شبه انسولینی ۱- (Insulin like growth factor-1 = IGF-1)، افزایش سیتوکاین‌هایی مثل فاکتور رشد مشتق از پلاکت (Platelet driven growth factor = PDGF)، رشد بافت پیوندی و (Connective tissue growth factor = CTGF) و همچنین استرس اکسیداتیو و آسیب حاصل از رادیکال‌های آزاد می‌باشند (۳-۱). علاوه بر این که استرس اکسیداتیو خود عاملی بر ایجاد و پیشرفت نفروپاتی دیابتی است، استرس اکسیداتیو محصول مشترک اکثر مکانیسم‌های آسیب زایی در دیابت بوده و نیز استرس اکسیداتیو می‌تواند سایر مکانیسم‌های آسیب زایی در نفروپاتی دیابتی (AgII, PDGF, AGEs, PKC, TGF) را تحریک نماید (۸-۴). بنابراین استرس اکسیداتیو به عنوان نقطه کانونی مکانیسم‌های آسیب‌زایی در دیابت به شمار می‌رود که بایستی در درمان مورد نظر قرار گیرد. شناخت و کنترل این مکانیسم‌ها راهی برای درمان و مهار پیشرفت نفروپاتی دیابتی است و از طرفی امروزه بیماران بیشتر متمایل به مصرف محصولات طبیعی و داروهای گیاهی هستند (۹).

گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) در طب سنتی در درمان برخی بیماری‌ها نظیر دیابت قندی، بیماری‌های تنفسی، مشکلات معدی و بیماری‌های التهابی به کار می‌رود. هم‌اکنون مشخص شده است که این گیاه حاوی مولکول‌های آنتی‌اکسیدانی چون رزمارینیک اسید، کارنازول و رزماری دیفنول می‌باشد (۱۰، ۱۱). در این بررسی رزمارینیک اسید به لحاظ ویژگی‌های مفیدش جهت مهار نفروپاتی دیابتی به کار رفت، این ویژگی‌ها شامل خواص آنتی‌اکسیدانتی، ضد التهابی کاهنده فاکتور هسته ای کاپا بتا (NFkB)، افزایشنده گلوکوتایون پراکسیداز، فعالیت ضد Bcl-2 و برداشت کننده پراکسی نیتريت می‌باشند (۱۶-۱۰). هیچ مطالعه‌ای بر تأثیر رزمارینیک اسید در تعدیل استرس اکسیداتیو در نفروپاتی دیابتی در حیوانات آزمایشگاهی صورت نگرفته است.

## مواد و روش‌ها

رت‌های نر از نژاد اسپراگ-داولی (Sprague Dawley) با سن دو ماهه از انستیتو پاستور کرج خریداری شدند و به آنها دو هفته استراحت داده شد تا با محیط جدید سازش پیدا کنند. بعد از سازش حیوانات ۴۰ رت به چهار گروه ۱۰ تایی به طور تصادفی تقسیم شدند. در این مطالعه تجربی تمامی رت‌ها تحت جراحی نفرکتومی طرف چپ (برداشتن کلیه چپ) قرار گرفتند. به دلیل این که ضایعات کلیوی دیابت نسبتاً دیررس هستند، از این رو برای به دست آوردن ضایعات شدیدتر و سریع‌تر و خصوصاً تسریع اسکروز گلومرولی تمامی حیوانات مورد مطالعه تحت جراحی نفرکتومی یکطرفه واقع شدند (۱۷). کارهای عملی بر اساس مصوبات کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی لرستان انجام گرفت. گروه یک به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. یک هفته بعد از جراحی، حیوانات گروه‌های دوم، سوم و چهارم برای ایجاد دیابت آماده شدند. بعد از گرسنگی شبانه ابتدا از حیوانات از طریق دم خونگیری به عمل آمد. هر حیوان با ترازوی الکترونیکی توزین و سپس آلوکسان

حدود ۴۸ ساعت بعد از ثبوت کلیه‌ها هر کلیه به اسلایس‌های تقریباً ۱ میلی‌متری (عمود بر محور طولی کلیه) بریده شد. بعد از پردازش بافتی برش‌های پارافینی به ضخامت ۵ میکرون از هر اسلایس تهیه شد. از هر اسلایس یک لام تهیه شد. برش‌ها با روش پرئودیگ اسید شیف تغییر نکند رنگ آمیزی شدند. جهت برآورد حجمی نواحی متفاوت کلیه از روش شمارش نقطه استفاده گردید.

تصویر میدان دید میکروسکوپ توسط دوربین متصل به میکروسکوپ به کامپیوتر منتقل و از طریق ویدئو پروژکتور به روی پروب (مربع ۱۱ × ۱۱ سانتیمتر دارای ۲۲۴ نقطه ترسیم شده روی کاغذ) چسبانده به دیوار تابانده شد. فاصله ویدئو پروژکتور به پروب طوری تنظیم شد تا با استفاده از لنز ۱۰ شیئی بزرگنمایی خطی نهایی ۸۰ باشد. برای محاسبه دانسیته حجمی گلومرول بر کورتکس از هر کلیه تمام لام‌های تهیه شده از اسلایس‌هایش بررسی شدند. با تاباندن تصویر میکروسکوپی میدان دید تصادفی از کورتکس به پروب، اگر گلومرولی در داخل پروب واقع و یا با اضلاع بالا و راست پروب برخورد می‌کرد مورد شمارش نقطه واقع و اگر گلومرولی با اضلاع پایین و چپ پروب برخورد داشت از محاسبه کنار گذاشته می‌شد. در هر لام دو تا سه میدان دید تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع بین ۷۰-۱۰۰ گلومرول برای هر کلیه مورد شمارش نقطه قرار گرفت دانسیته حجمی گلومرول از فرمول زیر برآورد گردید (۲۰، ۲۱).

$$\Sigma Pp / Vv(\text{glom/cortex}) = \Sigma Pp$$

$\Sigma Pp$  = مجموع تعداد نقاط که با گلومرول‌ها در  $n$  میدان تحت بررسی برخورد داشته‌اند.

$\Sigma Pt$  = مجموع تعداد نقاط پروب در  $n$  میدان دید تحت بررسی.

برآورد حجم تام گلومرول‌های کلیه :

جهت برآورد حجم تام گلومرول‌های کلیه نیز از فرمول زیر استفاده شد (۲۰). حجم بر حسب میلی متر مکعب به دست آمد و به جای حجم کلیه ( $V_{kid}$ ) وزن آن استفاده شد (۱ گرم =  $1\text{cm}^3$ ) (۲۲).

تتراهیدرات با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (محلول در آب مقطر) در ناحیه پوست پشت گردن به صورت زیر جلدی تزریق گردید (۱۸).

بیست و چهار ساعت بعد از تزریق آلوکسان بتدریج حیوانات علائم دیابتی شدن را نشان دادند. به طوری که مصرف آب آنها و حجم ادرار آنها زیاد می‌شد و ۳۶ ساعت بعد از تزریق آلوکسان ادرار حیوانات با کاغذهای تست کیفی گلوکز بررسی و وجود قند در ادرار مشخص گردید. برای اطمینان پنج روز بعد از تزریق آلوکسان از این حیوانات آزمایش قند خون به عمل آمد. چون قند خون آنها بیشتر از ۳۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر ( $16/7$  میلی مول بر لیتر) بود، تمامی آنها به عنوان حیوان دیابتی به حساب آمدند. حیوانات در شرایط تاریکی و روشنایی ۱۲/۱۲ ساعت، دمای  $21 \pm 3$  درجه سانتی گراد با آب و غذای فراوان نگهداری شدند (۸). در طول تحقیق هیچگونه انسولینی بکار برده نشد. در هر گروه هنگام تطابق با دیابت و سمیت آلوکسان در چند روز اول بعد از تزریق، ۴-۲ رت مردند. حیوانات به مدت ۸ هفته بعد از دیابتی شدن نگهداری شدند.

رزمارینیک اسید از شرکت سیگما-آلدریخ (۹۷ درصد  $C_{18}H_{16}O_8$ ) با وزن مولکولی ۳۶۰/۱۳۱ و شماره محصول ۵۳۶۹۵۴ خریداری گردید.

گروه‌های سوم و چهارم دیابتی تحت درمان با رزمارینیک اسید از روز اول القاء دیابت با دزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم روزانه از دهان و بطریقه گاوآژ تحت درمان قرار گرفتند (۱۹). بعد از ۸ هفته حیوانات ابتدا توزین و تحت بیهوشی از قلب خونگیری به عمل آمد. چند قطره از خون جهت تعیین قند خون با گلوکومتر به کار رفت. نمونه خون ۲۰ دقیقه در دمای اتاق حفظ و بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (۲۰۰۰ دور بر دقیقه) سرم به دست آمده در فریزر نگهداری شد. بعد از خونگیری و بعد از تزریق فیکساتیو در قلب، کلیه حیوان در وضعیت بیهوشی جدا، توزین گشته و بعد از شستشو در محلول فیکساتیو نرمال سالین ۱۰ درصد قرار داده شد.

کامپیوتر تصویر میدان دید میکروسکوپ به زیر یک گرید نقطه ای درشت (با فاصله نقاط ۶ میلی متر که بر صفحه پاورپوینت رسم شده بود) منتقل و نقاط برخورد با گلومرول (مویرگ ها و مزانژئوم) شمارش شد و تصویر در زیر پروب نقطه به وضوح دیده می شد (تصویر ۱). سپس تصویر همین گلومرول برگرید نقطه ای کوچک (با فاصله نقاط ۳ میلی متر بر صفحه پاورپوینت) منتقل و نقاط برخورد با مزانژئوم (ناحیه پاس مثبت درون گلومرول و هسته های محصور در این ماتریکس) با رعایت اصول شمارش نقطه شمارش گردید (تصویر ۲). دانسیته حجمی مزانژئوم بر گلومرول با فرمول زیر برآورد گردید (۲۳). بزرگنمایی دوربین میکروسکوپ ۲۴۵ برابر بود

$$Vv(\text{mes}/\text{glom}) = \text{FPM} / \text{CPG} \cdot 4$$

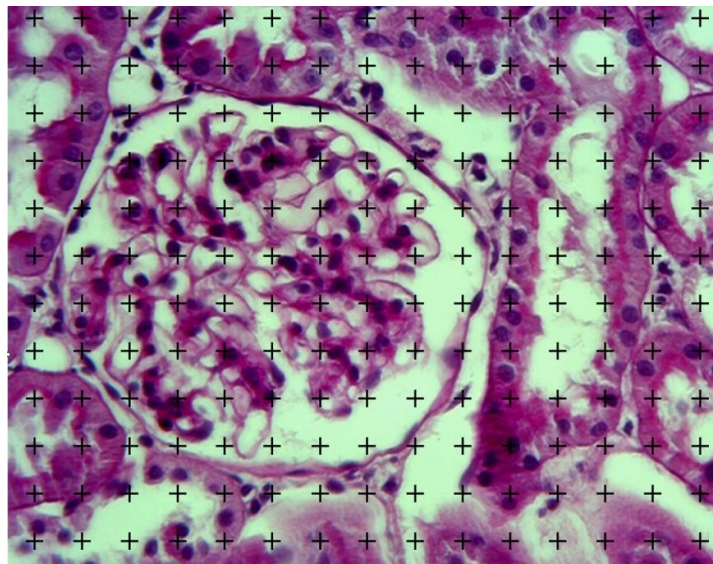
FPM باربر است با که در این فرمول مجموع نقاط کوچک بر خورد کرده با مزانژئوم، CPG بیانگر مجموع تعداد نقاط درشت برخورد کرده با گلومرول ها و ۴ نسبت مساحت یک نقطه بزرگ به مساحت یک نقطه کوچک می باشد.

$$V_{\text{total}}(\text{glom}/\text{kid}) = Vv(\text{glom}/\text{cortex}) \cdot [V_{\text{kid}} / Vv(\text{cortex}/\text{kid})]$$

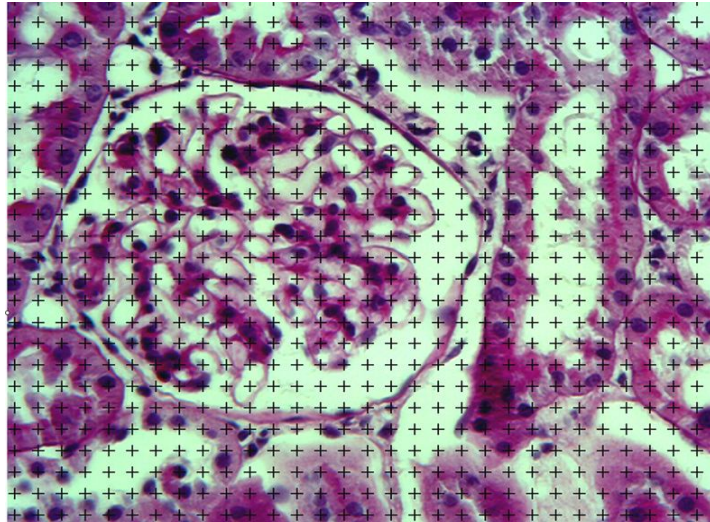
جهت برآورد دانسیته حجمی کورتکس بر کلیه نیز از روش شمارش نقطه استفاده گردید. تمام برش های تهیه شده از هر کلیه به کار گرفته شد. چون تصویر تمامی برش کلیه حتی از میدان دید لنز ۴ میکروسکوپ فراتر بود، دوربین بر روی یک لوپ نصب گردید و تصویر میدان دید به کمک کامپیوتر و ویدئو پروژکتور به یک پروب نقطه (با فاصله نقاط ۶ میلیمتر) تابانده شد در بزرگنمایی خطی ۲۰ برابر نقاط واقع بر کورتکس و نقاط واقع بر تمامی مقطع کلیه شمارش می شد. از نسبت نقاط شمرده شده در کورتکس تمام مقاطع مورد بررسی هر کلیه بر نقاط شمرده شده بر تمام مقاطع هر کلیه، دانسیته حجمی کورتکس بر کلیه (Vv(cortex/kid)) برآورد گردید.

#### برآورد دانسیته حجمی مزانژئوم بر گلومرول

جهت برآورد دانسیته حجمی مزانژئوم برای هر کلیه از هر اسلایس یک لام به کار رفت. از هر کلیه به طور متوسط مقطع ۴۰ گلومرول مورد بررسی قرار گرفت (۲۰). در بزرگنمایی ۲۰۰ میکروسکوپ یک گلومرول تصادفی انتخاب و به کمک دوربین متصل به میکروسکوپ و



تصویر ۱ قرار گرفتن تصویر میکروسکوپی در زیر یک پروب با فاصله نقاط ۶ میلیمتر را در صفحه پاورپوینت نشان می دهد (بزرگنمایی خطی نهایی ۴۸۰ برابر)



تصویر ۲ قرار گرفتن تصویر میکروسکوپی در زیر یک پروب با فاصله نقاط ۳ میلیمتر را در صفحه پاورپوینت نشان می‌دهد (بزرگنمایی خطی نهایی ۴۸۰ برابر)

با حاصل ضرب دانسیته حجمی مزانژوم در حجم گلومرول‌های کلیه، حجم تام مزانژوم برآورد گردید.

بر همان تصویر گلومرول افتاده بر گرید نقطه‌ای کوچک (تصویر ۲)، تعداد نقاط واقع بر فضای داخلی مویرگ‌های گلومرولی شمارش گردید و با استفاده از فرمول دانسیته حجمی مزانژوم بر گلومرول، دانسیته حجمی مویرگ گلومرولی بر گلومرول برآورد شد (به جای FPM مجموع نقاط کوچک واقع بر داخل لومن مویرگ قرار داده شد) و سپس با ضرب آن در حجم گلومرولی کلیه حجم تام مویرگ گلومرولی برآورد گردید.

مالون دی‌آلدئید سرمی به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی در نظر گرفته شد. مالون دی‌آلدئید با تست تیوباربتوریک اسید سنجیده شد. جذب ترکیب رنگی

مالون دی‌آلدئید-تیوباربتوریک اسید در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید (۲۴). داده‌ها به دست آمده به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ مورد بررسی قرار گرفت.

#### یافته ها

مقایسه قند خون رت‌های گروه‌های مختلف قبل و بعد از دیابتی شدن و همچنین بعد از هشت هفته درمان با رزمارینیک اسید نشان داد که رزمارینیک اسید تأثیر معنی‌داری بر کاهش قند خون رت‌های دیابتی ندارد (جدول ۱). به علاوه اثر آلوکسان بر افزایش قند خون در رت‌های دیابتی مشخص شد ( $p < 0.01$ ).

جدول ۱. اثر رزمارینیک اسید بر میزان قند خون در رت‌های دیابتی

گروه های آزمایشی	تعداد	قند خون (میانگین $\pm$ انحراف معیار) قبل از دیابت	قند خون (میانگین $\pm$ انحراف معیار) ۵ روز بعد از دیابتی شدن	قند خون (میانگین $\pm$ انحراف معیار) بعد از ۸ هفته درمان با رزمارینیک اسید
کنترل	۱۰ (۱۰)	۱۲۰/۸ $\pm$ ۸/۴	۱۱۵/۶ $\pm$ ۵/۵	۱۲۴/۸ $\pm$ ۴/۱
دیابتی بدون درمان	۱۰ (۶)	۱۳۵/۲ $\pm$ ۳/۱	* ۴۱۳/۲ $\pm$ ۳۳*	۴۲۵/۶ $\pm$ ۵۲/۷*
دیابتی+رزمارینیک اسید ۱۰۰ میلی گرم	۱۰ (۸)	۱۲۸/۴ $\pm$ ۶/۸	* ۴۷۹/۲ $\pm$ ۴۰/۴*	۴۵۶/۵ $\pm$ ۳۵/۱*
دیابتی+رزمارینیک اسید ۲۰۰ میلی گرم	۱۰ (۸)	۱۱۲/۲ $\pm$ ۷	* ۳۹۹/۱ $\pm$ ۴۱/۸*	* ۳۵۶ $\pm$ ۱۲/۱*

\* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ( $P < 0.01$ )، # اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه دیابتی بدون درمان ( $P < 0.01$ )

نتایج نشان داد مصرف رزمارینیک اسید جهت پیش گیری از نفروپاتی دیابتی به طور معنی داری موجب مهار گسترش مزانژال نسبت به گروه دیابتی بدون درمان شده است، ولی نتوانسته است آنرا در سطح گروه کنترل حفظ نماید ( $p < 0/01$ ). بین دو دز درمانی تفاوت معنی داری در مهار گسترش مزانژال دیده شد (جدول ۲).

مقایسه حجم مویرگ گلوامرولی در گروه های آزمایشی نشان داد مصرف رزمارینیک اسید فقط در دوز ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم توانسته است به طور معنی داری نسبت به گروه دیابتی بدون درمان کاهش حجم مویرگ گلوامرولی را مهار نماید، ولی نتوانسته است آن را در سطح کنترل حفظ نماید ( $p < 0/01$ ) (جدول ۲).

مقایسه مالون دی آلدئید در گروه های آزمایشی نشان داد که مصرف رزمارینیک اسید توانسته است در گروه های دیابتی سوم و چهارم به طور معنی داری پراکسیداسیون لیپیدی را در مقایسه با گروه دیابتی بدون درمان مهار نماید و به طور معنی داری آن را در سطح گروه کنترل حفظ کند ( $p < 0/01$ ) (جدول ۲).

مقایسه حجم گلوامرولی در کلیه (بر حسب میلی-متر مکعب) در گروه های مورد مطالعه نشان می دهد، درمان پیش گیری با مصرف رزمارینیک اسید در گروه های دیابتی سوم و چهارم نتوانسته است به طور معنی داری افزایش حجم گلوامرولی (هیپرتروفی گلوامرولی) را مهار ولی نتوانسته آن را در سطح کنترل حفظ نماید ( $p < 0/01$ ) (جدول ۲).

جدول ۲. اثر رزمارینیک اسید بر میزان مالون دی آلدئید، حجم گلوامرولی، حجم مزانژنوم و حجم مویرگ گلوامرولی بر کلیه (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

گروه های آزمایشی	تعداد	مالون دی آلدئید سرمی (نانومول بر میلی لیتر)	حجم گلوامرول (میلی متر مکعب)	حجم مزانژنوم (میلی متر مکعب)	حجم مویرگ گلوامرولی (میلی متر مکعب)	وزن کلیه (گرم)
کنترل	۱۰	۰/۵۱ $\pm$ ۰/۱۲	۲۳/۷۶ $\pm$ ۰/۹۹	۳/۵۸ $\pm$ ۰/۳	۲۲/۳۷ $\pm$ ۰/۹۱	۱/۱۶ $\pm$ ۰/۲۹
دیابتی بدون درمان	۶	* ۱/۷۵ $\pm$ ۰/۲	* ۵۵/۵۳ $\pm$ ۰/۴۷	* ۷/۳۷ $\pm$ ۰/۴	* ۱۶/۳ $\pm$ ۰/۷۲	* ۱/۵۱ $\pm$ ۰/۳
دیابتی+رزمارینیک اسید ۱۰۰ میلی گرم	۸	# ۰/۶۸ $\pm$ ۰/۵	* # ۳۰/۷ $\pm$ ۱/۶۱	* # ۵/۰۲ $\pm$ ۰/۴۷	* ۱۷/۴۸ $\pm$ ۱/۰۳	# ۱/۱۹ $\pm$ ۰/۱
دیابتی+رزمارینیک اسید ۲۰۰ میلی گرم	۸	# ۰/۵۹ $\pm$ ۰/۵	* # ۳۲/۵۳ $\pm$ ۲/۱۸۶	* # ۵/۳۹ $\pm$ ۰/۵۱	* # ۱۸/۹۱ $\pm$ ۰/۴۹	* # ۱/۳۲ $\pm$ ۰/۲

# اختلاف معنی دار نسبت به گروه دیابتی بدون درمان ( $P < 0/01$ ), \* اختلاف معنی دار نسبت به گروه کنترل ( $P < 0/01$ )

## بحث

فعال کردن پروتئین کیناز سی (PKC) می تواند موجب آسیب کلیوی شود (۷). استرس اکسیداتیو می تواند سایر مکانیسم ها چون سیستم رنین-آنژیوتانسین، مسیر پولی اول یا مسیر هگزوکیناز، پروتئین کیناز سی (PKC) و محصولات نهایی گلیکوزیله نوین را فعال کند (۶-۱). مکانیسم های آسیب زایی چون سیستم آنژیوتانسین II از طریق ایجاد سوپر اکسید و محصولات گلیکوزیله نهایی با تولید گونه های واکنش اکسیژن از طریق استرس اکسیداتیو ایجاد ضایعه می کنند (۱)، (۴، ۵، ۷). در این دید نو با بررسی در مکانیسم های آسیب زایی در نفروپاتی دیابتی می توان گفت، استرس اکسیداتیو علاوه بر این که به طور مستقیم ایجاد ضایعه کلیوی می نماید رد

این مطالعه جهت بررسی اثر رزمارینیک اسید بر حفظ ساختار کلیوی در نفروپاتی دیابتی انجام گرفته است. نظر به چند عاملی بودن مکانیسم آسیب زایی در نفروپاتی دیابتی، درمان نگهدارنده بایستی در چندین مکانیسم آسیب زایی دخالت کند. از بررسی های انجام شده در خصوص مکانیسم آسیب زایی نفروپاتی دیابتی با توجه به اطلاعات امروزی می توان گفت به دنبال هیپرگلیسمی استرس اکسیداتیو خود ایجاد ضایعه کلیوی می کند، مثلا رادیکال آزاد سوپر اکسید از طریق پراکسیداسیون لیپیدی، فعال کردن فاکتور هسته ای کاپا-بتا، تولید پراکسی نیتريت،

پای استرس اکسیداتیو در آسیب‌زائی سایر مکانیسم‌ها دیده شده و استرس اکسیداتیو می‌تواند سایر مکانیسم‌ها را تحریک کند.

بررسی حاضر نشان داد که مالون دی‌آلدئید سرمی (شاخص پراکسیداسیون لیپیدی) با مصرف رزمارینیک اسید در هر دو دوز درمانی در دیابتی‌های تحت درمان (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به طور معنی‌داری استرس اکسیداتیو را مهار و مالون دی‌آلدئید سرمی را در سطح کنترل حفظ نموده است، که این خود از قابلیت بالای آنتی‌اکسیدانی این ماده می‌باشد.

هم‌چنین این مطالعه اثر معنی‌دار رزمارینیک اسید را در مهار هیپرتروفی گلوبروولی در دیابتی‌های تحت درمان نسبت به دیابتی‌های بدون درمان نشان داد. مهار هیپرتروفی گلوبروولی نیز با آنتی‌اکسیدانت‌هایی چون ویتامین E و آلفا توکوفرول گزارش شده است (۲۶،۲۵).

دیابت موجب تولید بیش از حد ماتریکس مزانژال شده و منجر به گسترش مزانژال (گلوبرولولواسکلروز) می‌گردد. مصرف رزمارینیک اسید هر چند نتوانسته است حجم مزانژوم را در سطح گروه کنترل حفظ کند، ولی نسبت به دیابتی‌های بدون درمان تفاوت معنی‌داری را در مهار گسترش مزانژال نشان داد. گزارشاتی است که مصرف ویتامین C، آلفا لیپوئیک اسید، ویتامین E و فرولیک اسید نتوانسته است اسکلرز گلوبروولی را در رت‌های دیابتی تعدیل نماید (۲۹-۲۷).

در حفظ مویرگ گلوبروولی درمان با رزمارینیک اسید فقط در دیابتی‌های تحت درمان با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نسبت به دیابتی بدون درمان داشت، هر چند نتوانسته است حجم توده مویرگ گلوبروولی را در سطح کنترل حفظ نماید. در بررسی‌های گذشته در خصوص حجم مویرگ گلوبروولی در دیابت گزارشی دیده نشد.

علیرغم مهار مالون دی‌آلدئید سرمی، در هیچ‌کدام از متغیرهای مربوط به گلوبروولی (هیپرتروفی گلوبروولی - اسکلرز گلوبروولی و حجم مویرگ گلوبروولی)

مصرف رزمارینیک اسید نتوانست سطح آن متغیر را در سطح کنترل حفظ نماید.

بر خلاف گزارشات بررسی‌های تجربی زیادی مبنی بر اثر مفید آنتی‌اکسیدان‌ها بر مهار نفروپاتی دیابتی، شواهدی بر اثر بخشی این ترکیبات در بررسی‌های کلینیکی بر بهبود نفروپاتی دیابتی وجود ندارد و حتی بدتر هم بوده است (۳۰).

مطالعات تجربی نقش استرس اکسیداتیو در شروع و پیشرفت نفروپاتی دیابتی را نشان داده‌اند. در نفروپاتی دیابتی ضایعات ساختاری کلیه سال‌ها قبل از تشخیص با ملاک‌های آزمایشگاهی چون وجود آلبومین در ادرار، فشار خون بالا و کاهش تصفیه گلوبروولی صورت می‌گیرد (۳۱). بنابراین دیابتی‌ها نباید انتظار بکشند تا علائم کلینیکی و آزمایشگاهی نفروپاتی دیابتی دیده شود و درمان را شروع کنند بلکه با توجه به نقش استرس اکسیداتیو به عنوان نقش کلیدی در شروع و پیشبرد نفروپاتی دیابتی پیشنهاد می‌شود دیابتی‌هایی که به نفروپاتی نرسیده‌اند، به عنوان یک درمان پیش‌گیرنده و کندکننده پیشرفت نفروپاتی دیابتی از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده نمایند (۲۹).

نظر به این که اثرات ثانویه هیپرگلیسمی به هیپرگلیسمی دائم وابسته نیست، تنها کنترل گلوکز نمی‌تواند مانع رسیدن به نفروپاتی دیابتی شود (۳۲). حتی با این که مصرف رزمارینیک اسید تاثیر معنی‌داری بر کاهش قند خون رت‌های دیابتی نداشته است، ولی نتوانسته است هیپرتروفی گلوبروولی، گلوبرولولواسکلرز و کاهش مویرگ گلوبروولی را نسبت به دیابتی‌های بدون درمان به طور معنی‌داری بهبود ببخشد. نفرون‌ها قبل از تولد و کمی بعد از تولد ساخته می‌شوند و بعد از آن دیگر نفروژنزی وجود نخواهد داشت. بنابر این با ایجاد ضایعات گلوبروولی توان تصفیه‌ای کلیه کاهش و تعداد نفرون‌ها نیز رو به کاهش خواهد گذاشت.

اگر چه جزئیات مولکولی مکانیسم‌های حفاظتی رزمارینیک اسید در مهار نفروپاتی دیابتی نمی‌تواند کاملاً با نتایج ما توضیح داده شود، مصرف این عصاره با خواص



Radical Biology and Medicine. 2008;44(7):1217-31.

7. Ha H, Hwang IA, Park JH, Lee HB. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Diabetes research and clinical practice. 2008;82:S42-S5.

8. Haidara MA, Mikhailidis DP, Rateb MA, Ahmed ZA, Yassin HZ, Ibrahim IM, et al. Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced Type 1 diabetes. Journal of Diabetes and its Complications. 2009;23(2):130-6.

9. Al-Qattan K, Thomson M, Ali M. Garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) attenuate structural nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism. 2008;3(2):e62-e71.

10. Huang S, Zheng R. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. Cancer letters. 2006;239(2):271-80.

11. Bakİrel T, Bakİrel U, Keles OÜ, Ülgen SG, Yardibi H. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. Journal of ethnopharmacology. 2008;116(1):64-73.

12. Petersen M, Simmonds MSJ. Rosmarinic acid. Phytochemistry. 2003;62(2):121-5.

13. Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. Toxicology. 2008;250(2-3):109-15.

14. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry. 2008;110(1):76-82.

15. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. Cardiovascular Diabetology. 2005;4(1):5-9.

16. Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Itoh A, Nabeshima T. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against

فوق به دیابتی ها به ویژه آنهایی که به نوروپاتی دیابتی نرسیده‌اند، قبل از این که به نوروپاتی دیابتی برسند توصیه می‌گردد.

### نتیجه گیری

مصرف رزمارینیک اسید در رتهای دیابتی به طور معنی داری هیپرتروفی گلومرولی، گسترش مزانژال و کاهش حجم مویرگ گلومرولی را نسبت به دیابتی‌های بدون درمان بهبود می بخشد.

### تشکر و قدر دانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان به لحاظ تأمین بودجه مالی این طرح و نیز ریاست و کارکنان مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان صمیمانه قدر دانی می‌گردد.

### منابع

1. Vasavada N, Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. Advances in chronic kidney disease. 2005;12(2):146-54.
2. Kang ES, Lee GT, Kim BS, Kim CH, Seo GH, Han SJ, et al. Lithospermic acid B ameliorates the development of diabetic nephropathy in OLETF rats. European journal of pharmacology. 2008;579(1-3):418-25.
3. Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. Journal of the American Society of Nephrology. 2005;16(3 suppl 1):S30-S33.
4. Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. Atherosclerosis. 2009;202(2):321-9.
5. Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2006;142(3-4):317-27.
6. Choi SW, Benzie IFF, Ma SW, Strain J, Hannigan BM. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? Free

- impairment of memory induced by A [beta] 25-35. Behavioural brain research. 2007;180(2):139-45.
17. Bi-Cheng L, Qi C, Dong-Dong L, Jing S, AO P, Xiong-Zhong R, et al. Mechanisms of irbesartan in prevention of renal lesion in streptozotocin-induced diabetic rats. Acta pharmacologica Sinica. 2003;24(1): 67-73.
18. Fernandes NPC, Lagishetty CV, Panda VS, Naik SR. An experimental evaluation of the antidiabetic and antilipidemic properties of a standardized Momordica charantia fruit extract. BMC complementary and alternative medicine. 2007;7(1):29.
19. Makino T, Ono T, Liu N, Nakamura T, Muso E, Honda G. Suppressive effects of rosmarinic acid on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. Nephron. 2000;92(4):898-904.
20. Kim KH, Kim Y, Park HW, Jeong HJ, Mauer M. A re-evaluation of the renal ablation model of progressive renal disease in rats. Journal of nephrology. 2003;16(2):196-202.
21. Gundersen H, Bendtsen T, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. Apmis. 1988;96(1 6):379-94.
22. Woods LL, Ingelfinder JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. Pediatric research. 2001;49(4):460-7.
23. Drummond K, Mauer M. The Early Natural History of Nephropathy in Type 1 Diabetes. Diabetes. 2002;51(5):1580-7.
24. Afshari AT, Shirpoor A, Farshid A, Saadatian R, Rasmi Y, Saboory E, et al. The effect of ginger on diabetic nephropathy, plasma antioxidant capacity and lipid peroxidation in rats. Food Chemistry. 2007;101(1):148-53.
25. Kim SS, Gallaher D, Csallany AS. Vitamin E and probucol reduce urinary lipophilic aldehydes and renal enlargement in streptozotocin-induced diabetic rats. Lipids. 2000;35(11):1225-37.
26. Nascimento Gomes G, Barbosa F, Radaeli R, Cavanal M, Mello Aires M, Zaladek Gil F. Effect of D-alpha-tocopherol on tubular nephron acidification by rats with induced diabetes mellitus. Brazilian journal of medical and biological research. 2005;38(7):1043-51.
27. Lee EY, Lee MY, Hong SW, Chung CH, Hong SY. Blockade of oxidative stress by vitamin C ameliorates albuminuria and renal sclerosis in experimental diabetic rats. Yonsei Medical Journal. 2007;48(5):847-55.
28. Winiarska K, Malinska D, Szymanski K, Dudziak M, Bryla J. Lipoic acid ameliorates oxidative stress and renal injury in alloxan diabetic rabbits. Biochimie. 2008;90(3):450-9.
29. Fujita A, Sasaki H, Doi A, Okamoto K, Matsuno S, Furuta H, et al. Ferulic acid prevents pathological and functional abnormalities of the kidney in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty diabetic rats. Diabetes research and clinical practice. 2008;79(1):11-7.
30. Obrosova IG, Fathallah L, Liu E, Nourooz-Zadeh J. Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-[alpha]-lipoic acid. Free Radical Biology and Medicine. 2003;34(2):186-95.
31. Caramori ML, Kim Y, Huang C, Fish AJ, Rich SS, Miller ME, et al. Cellular Basis of Diabetic Nephropathy. Diabetes. 2002;51(2):506-13.
32. Dalla Vestra M, Fioretto P, editors. Diabetic nephropathy: Renal structural studies in type 1 and type 2 diabetic patients. International Congress Series. 2003;1253: 163-9.