

بررسی بیوشیمیایی و هیستولوژیک اثر حفاظتی سدیم تنگستات بر استرس اکسیداتیو ناشی از استرپتوزوتوسین در پانکراس رتهای دیابتیک

بینا مودی، M.Sc.*، زهرا حیدری، Ph.D.**، حمیدرضا محمودزاده نایب، Ph.D.**، مهدی هراتی، Ph.D.***

* گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات تهران

** بخش بافت شناسی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

*** گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

تاریخ وصول: آبان ماه ۸۶، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۶

چکیده

هدف: بررسی اثر حفاظتی سدیم تنگستات بر استرس اکسیداتیو ناشی از استرپتوزوتوسین در پانکراس رتهای دیابتیک

مواد و روشها: روش مورد استفاده در این تحقیق، روش تجربی است. ۶۰ رت نر بالغ ۳-۲ ماهه از نژاد ویستار (Wistar) انتخاب و به طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند (n=10): کنترل (C)، رتهای دیابتی القا شده توسط استرپتوزوتوسین (D)، رتهای دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات (محلول ۱ mg/ml) در آب آشامیدنی از یک هفته پیش از القا دیابت و در طول دوره آزمایش (TDB: Treatment Diabetes Before injection of STZ)، دیابتی تحت رژیم غذایی (FRD: Food Restricted Diabetic) که میزان غذایی معادل آنچه گروه TDB مصرف می نمود، دریافت داشتند، رتهای کنترل سالم تحت درمان با سدیم تنگستات (TC)، رتهای دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات از یک هفته پس از القا دیابت (TDA: Treatment Diabetes After in injection of STZ)، غذا و مایعات مصرفی به صورت روزانه، و وزن بدن، گلوکز و انسولین خون نیز به صورت هفتگی اندازه گیری شد. در پایان تجربه (پنج هفته پس از القای دیابت) پس از گرسنگی شبانه، حیوانات توسط اتر بیهوش و نمونه های خون از ورید دمی جمع آوری شد. گلوکز پلاسما با استفاده از متد زوج آنزیمی گلوکز اکسیداز- پراکسیداز و انسولین سرم توسط کیت فوق حساس اندازه گیری انسولین رت و دستگاه الیزا اندازه گیری شد. پانکراس سریعاً برداشته شد و بخشی از آن برای تعیین قدرت آنتی اکسیدانی در محلول سالین سرد قرار داده شد. برای تعیین میزان استرس اکسیداتیو غلظت عامل واکنشگر تیوباربیتوریک اسید (TBARS) در خون و پانکراس بر حسب نانومول کمپلکس MDA - TBA محاسبه شد. قدرت آنتی اکسیدانی خون و پانکراس با اندازه گیری قدرت احیاء کنندگی / آنتی اکسیدانی فریک (FRAP) محاسبه شد. و بخش دیگر پانکراس برای مطالعه بافت شناسی در تثبیت کننده Lillie تغییر یافته قرار داده شد. پس از ثبوت نمونه ها و قالبگیری در پارافین و توسط میکروتوم برشهایی به ضخامت ۴ میکرون تهیه شد. به منظور رنگ آمیزی سلولهای بنای گرانول دار، مقاطع با استفاده از روش هیستوشیمیایی آلدئید فوشین تغییر یافته رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی (Tukeys Post hoc) صورت گرفت. سطح معنی دار بودن $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

✉ آدرس مکاتبه: زاهدان، بزرگراه خلیج فارس، پردیس، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده

E-mial: histology_iri@yahoo.com

پزشکی، بخش بافت شناسی

یافته‌ها: سطح گلوکز خون گروه TDB در طول دوره آزمایش نسبت به سایر گروه‌های دیابتی کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.01$) و نسبت به گروه‌های کنترل نیز قابل مقایسه بود. انسولین خون در گروه‌های D، TDA، TDB و FRD نسبت به گروه‌های کنترل C و TC کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.01$). همچنین قدرت آنتی اکسیدانی در خون و پانکراس گروه TDB در مقایسه با D، TDA و FRD افزایش معنی داری نشان داد ($P < 0.01$). پراکسیداسیون لیپید در خون و پانکراس گروه TDB نسبت به D، TDA و FRD کاهش معنی داری نشان داد ($P < 0.01$). بررسی هیستولوژیک نشان داد که بتا سل‌های گرانول دار در رت‌های TDB نسبت به D، TDA و FRD افزایش واضحی دارند.

نتیجه‌گیری: سدیم تنگستات موجب کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش قدرت آنتی اکسیدانی در خون و پانکراس رت‌ها می‌شود و به این ترتیب کاربرد آن پیش از تزریق استرپتوزوتوسین باعث حفظ سلول‌های بتا از آسیب ناشی از استرپتوزوتوسین خواهد شد.

کلید واژه‌ها: سدیم تنگستات، دیابت، استرس اکسیداتیو، قدرت آنتی اکسیدانی، بافت شناسی

مقدمه

دیابت یک بیماری ناشی از اختلال متابولیسم کربوهیدرات‌هاست که نتیجه نقص ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس، نقص عملکرد انسولین یا هر دو است [۱ و ۲]. یکی از بارزترین علائم دیابت افزایش گلوکز خون است که نتیجه کاهش مصرف گلوکز توسط کبد و بافت‌های محیطی و همچنین افزایش تولید گلوکز بوسیله کبد است [۳]. هیپرگلیسمی اولین تظاهر کلینیکی دیابت و مهم‌ترین عامل موثر پیشرفت عوارض ناشی از دیابت است [۴ و ۵]. همچنین در برخی از مکانیسم‌های تولید کننده دیابت یکسری رادیکال‌های آزاد و فعال تولید می‌شوند که می‌توانند به مرور زمان روی سلول‌های بتا اثر نموده و باعث تخریب سیتوتوکسیک این سلول‌ها شوند که نتیجه آن تولید دیابت تیپ I است [۶]. افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و کاهش مکانیسم تدافعی آنتی اکسیدانی موجب آسیب ارگان‌های سلولی، آنزیم‌ها، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش مقاومت انسولین می‌شود [۷-۹]. همچنین اکسیژن فعال در کارکرد طبیعی پانکراس تاثیرگذار است. مقدار آنزیم‌های کلیدی موثر در جاروب کردن گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در جزایر پانکراس نسبت به سایر بافت‌ها کمتر است که این

امر موجب افزایش احتمال آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها می‌شود [۱۰ و ۱۱]. بیان ژن و فعالیت تعدادی از آنزیم‌های کلیدی و آنتی اکسیدانی پانکراس، مانند سوپراکسید دیس موتاز و کاتالاز در مقایسه با بافت‌هایی مانند کبد کم می‌شود [۱۲]. کاهش بیان ژن آنزیم‌های آنتی اکسیدان به نوعی موجب افزایش آسیب پذیری سلول‌های بتا در برابر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و افزایش صدمات ناشی از رادیکال‌های آزاد و در نهایت مرگ سلول‌های بتا در بیماری دیابت نوع I خواهد شد [۱۳]. به نظر می‌رسد رادیکال‌های آزاد اکسیژن (OFRs) مانند رادیکال‌های هیدروکسیل (OH°) [۱۴ و ۱۵] نیتریک اکسید (NO°) [۱۶] در عملکرد توکسیک استرپتوزوتوسین مشارکت دارند. رادیکال‌های بسیار فعال کربونیوم ناشی از تخریب ملکول‌های استرپتوزوتوسین نیز می‌تواند موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (OFRs) شود. این ترکیبات می‌توانند بر آندوتلیوم موینه‌های جزایر پانکراس [۱۷] و تفکیک DNA هسته ای در سلول‌های بتا [۱۴ و ۱۸] آثار مستقیم یا غیر مستقیم اعمال نمایند. امروزه محققین به دنبال ترکیباتی هستند که قادر باشند در برابر عوامل تخریب کننده سیتوتوکسیک سلول‌های بتای پانکراس را حفاظت نمایند [۱۹ و ۲۰]. دسته ای از این ترکیبات خانواده

بروز دیابت نوع I جلوگیری نماید ضروری است. آثار حفاظتی سدیم تنگستات در پیشگیری از آسیب سلولهای بتا توسط استرپتوزوتوسین در مدل‌های دیابتی حیوانی نوع I، پیش از این بررسی نشده است. در بعضی مطالعات مشخص شده است که سدیم تنگستات موجب بهبود عوارض ناشی از دیابت می‌شود [۳۰]. با توجه به اینکه درمان دیابت یکی از اهداف درمانی و جزو اولویتهای پژوهشی کشور محسوب می‌شود، مطالعه حاضر به منظور بررسی پیشگیری از دیابت و آثار حفاظتی سدیم تنگستات در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین در سلولهای بتا پانکراس و کنترل گلیسمی رتهای دیابتی نوع I با استفاده از بررسیهای بیوشیمیایی و بافت شناسی صورت گرفت.

مواد و روشها

تیمار موشها

۶۰ رت (Rat) نر بالغ (۳-۲ ماهه) از نژاد Wistar با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم از حیوانخانه مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی زاهدان انتخاب و در شرایط استاندارد و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. پس از یک هفته زمان سازش با محیط جدید رتها به طور تصادفی به شش گروه تقسیم شدند (n=10): رتهای شاهد سالم گروه کنترل (C) که در خوردن و آشامیدن آزاد بودند، رتهای شاهد تحت درمان با محلول سدیم تنگستات ۱mg/ml Tungstate control (TC)، رتهای دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (۱mg/kg Diabetic (D) (۵۰body weight)، رتهای دیابتی که محلول سدیم تنگستات ۱mg/ml را از یک هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین، به عنوان آب آشامیدنی مصرف نموده اند (TDA) Treatment Diabetes After injection of STZ، رتهای دیابتی که محلول سدیم تنگستات ۱mg/ml را از یک هفته قبل از تزریق استرپتوزوتوسین تا پایان دوره آزمایش (هفته پنجم)

عناصر کم مقدار هستند. در سالهای اخیر عناصر معدنی متعددی شناخته شده اند که اثرهای انسولین را تقلید کرده یا فعالیت انسولین را افزایش می‌دهند. این ترکیبات شامل مشتقات وانادیم [۲۱]، کرم، مولیبدن، کبالت و روی هستند [۲۲]. از میان این عناصر املاح عنصر تنگستن بیشتر از سایر عناصر کم مقدار مورد توجه قرار گرفته است [۲۳]. نتایج نشان می‌دهد که تنگستن می‌تواند فعالیت‌های شبه انسولینی را تقلید نماید [۲۴ و ۲۵]. همچنین اعمال خوراکی تنگستات موجب نرمال شدن قند خون در رتهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین می‌شود و در نتیجه متابولیسم گلوکز کبدی را در مسیر کاملاً درست قرار می‌دهد [۲۵]. از طرفی کاربرد خوراکی آن در رتهای چاق دیابتی Zucker باعث ایجاد کاهش قابل توجهی در قند خون و از طریق بازیافت متابولیسم گلوکز کبدی می‌شود. سدیم تنگستات دارای اثرهای ضد دیابتی نیز است که می‌تواند هیپرگلیسمی را در مدل‌های دیابتی وابسته به انسولین و مستقل از انسولین تصحیح کند و در درمان طولانی مدت با سدیم تنگستات، هموستاز گلوکز بازیافت شده و از برخی مشکلات مرتبط با دیابت ممانعت نماید [۲۶]. هنگامی که سدیم تنگستات به صورت خوراکی اعمال می‌شود یک عامل آنتی دیابتی قوی خواهد بود و در کشت هیپاتوسیتها نیز عملکرد شبه انسولینی نشان می‌دهد، به این ترتیب که موجب افزایش سنتز و تجمع گلیکوژن می‌شود، بدون اینکه اثر سمی بر کشت هیپاتوسیتها یا نمونه‌های سلولی داشته باشد [۲۷]. همچنین گزارشها نشان می‌دهد تنگستات موجب نوزایی سلولهای بتای پانکراس در نوزاد رتهایی می‌شود که توسط استرپتوزوتوسین دیابتی شده اند که یک مدل از دیابت نوع II است [۲۸]. دیابت ملیتوس نوع I از طریق تخریب گزینشی سلولهای بتای تولید کننده انسولین در جزایر پانکراس ایجاد می‌شود [۲۹]. از این رو جستجوی عوامل جدیدی که بتواند سلولهای بتا را در برابر تخریب محافظت کند و در نتیجه از

ارزیابی پراکسیداسیون لیپیدها اندازه گیری می‌شود. در این آزمایش غلظت عامل واکنش گر تیوباربتوریک اسید (TBARS) در خون و پانکراس معرف میزان استرس اکسیداتیو است. بدین منظور به ۰/۲ میلی لیتر هموژنه بافت یا پلاسما، ۰/۸ میلی لیتر بافر سدیم فسفات با pH=۷/۴ و ۰/۲۵ میلی لیتر Botylated hydroxyl toluene (BHT) اضافه گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر Trichloro Acetic Acid (TCA) ۳۰٪، به آن افزوده شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲ ساعت در یخ قرار گرفتند. سپس با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. یک میلی لیتر از سوپرناتانت تولید شده به لوله دیگر منتقل شد که در آن ۰/۰۷۵ میلی لیتر EDTA و ۰/۲۵ میلی لیتر تیوباربتوریک اسید (TBA) محلول در سود وجود داشت. محتوای لوله‌ها مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق جذب لوله‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت MDA بر حسب نانومول کمپلکس MDA-TBA به دست آمد. در نهایت عامل واکنش گر تیوباربتوریک اسید (TBARS) به ازاء میلی گرم پروتئین بافت محاسبه شد. BHT نیز به منظور ممانعت از افزایش MDA در حین آزمایش در محیط invitro استفاده شد [۳۴]. قدرت آنتی اکسیدانی خون و پانکراس با اندازه گیری قدرت احیاء کنندگی / آنتی اکسیدانی فریک (FRAP: Ferric Antioxidant Power) محاسبه می‌شود. سنجه FRAP قدرت آنتی اکسیدانی پلاسما و هموژنه بافت را محاسبه می‌کند [۳۵ و ۳۶]. به ۵۰ μl از نمونه پلاسما یا هموژنه پانکراس، ۱/۵ میلی لیتر محلول واکنش گر FRAP که قبلاً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم شده بود اضافه شد. ۴ دقیقه پس از انکوباسیون در دمای اتاق جذب لوله‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت شد. نتایج بر حسب μmol/l آهن به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه شد. غلظت پروتئین براساس روش Folin-Ciocalteu و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد محاسبه شد [۳۷].

به عنوان آب آشامیدنی مصرفی روزانه مصرف نموده اند (TDB) Treatment Diabetes Before injection of STZ، رتهای دیابتی تحت محدودیت غذایی (FRD) Food Restricted Diabetic که میزان غذای این گروه بر مبنای میزان مصرف غذای گروه TDB که در ساعت ۹ و ۱۸ هر روز انجام می‌شد. غذا و مایعات مصرفی و ادرا همه گروهها به صورت روزانه و وزن بدن، گلوکز و انسولین خون نیز به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد.

مطالعه بیوشیمیایی سطح گلوکز و انسولین

در پایان دوره درمان و پس از یک گرسنگی شبانه، حیوانات توسط اتر بیهوش و نمونه خون از ورید دمی گرفته شد. گلوکز پلاسما با استفاده از متد زوج آنزیمی گلوکز اکسیداز-پراکسیداز اندازه گیری شد [۳۱]. براساس این روش غلظت گلوکز تا محدوده ۴۰۰ mg/dl خطی بوده و از قانون بیر-لامبرت تبعیت می‌کند. نمونه‌هایی که غلظت گلوکز بیش از این مقدار را داشته‌اند، رقیق شده و در پایان ضریب تصحیح رقت منظور شده است. انسولین سرم رت توسط کیت فوق حساس اندازه گیری انسولین رت و با استفاده از دستگاه ELISA اندازه گیری شد.

مطالعه بیوشیمیایی سنجه قدرت اکسیدانی و آنتی اکسیدانی

پس از گردن زنی حیوانات، پانکراس برداشته شد. بخشی از آن در محلول سالین سرد قرار داده شد تا برای تعیین قدرت آنتی اکسیدانی از آن استفاده شود. یکی از محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، هیدروپراکسیدها هستند که در اثر متابولیزه شدن در سیستم‌های بیولوژیکی به فرم آلدئید در خواهند آمد [۳۲ و ۳۳]. تشخیص و اندازه گیری این ترکیبات به عنوان یک شاخص پراکسیداسیون لیپیدها محسوب می‌شود. یکی از فرمهای آلدئیدی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، مالون دی آلدئید (MDA) بوده که به عنوان یک مارکر

مطالعه بافت شناسی

بخشی از بافت پانکراس به منظور مطالعه بافتی در محلول ثبیت کننده لیلی (Lillie) تغییر یافته با pH برابر با ۷/۲ تا ۷/۴ قرار داده شد. پس از ثبوت کامل بافت پانکراس، آب گیری در درجات صعودی الکل اتیلیک، شفاف سازی با زایلن، قالب گیری در پارافین انجام گرفت. توسط میکروتوم برش هایی به ضخامت ۴ میکرون تهیه شد. به منظور رنگ آمیزی سلولهای بتای گرانول دار، مقاطع با استفاده از روش هیستوشیمیایی آلدئید فوشین بازی تغییر یافته رنگ آمیزی شدند [۳۸] نمونه های تهیه شده مورد بررسی میکروسکوپی نوری و فتوگرافی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

پس از استخراج اطلاعات و تجزیه و تحلیل برای اثبات تبعیت داده ها از توزیع نرمال ابتدا آزمون کولموگروف-

اسمیرونوف (One sample kolmogov- smironov test) انجام پذیرفت. آزمون evene به منظور بررسی همسانی واریانسها مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Tukeys Post hoc برای مقایسه میانگینها و تفاوت گروههای آزمایشی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به صورت $Mean \pm SE$ گزارش شد. برای آنالیز داده ها از نرم افزار آماری SPSS ویرایش یازدهم استفاده شد. سطح معنی داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها

میانگین وزن، میزان مصرف آب و غذا و میزان ادرار رت ها در جدول ۱ نشان داده شده است. در گروه TDB کاربرد سدیم تنگستات قبل از القای دیابت، پرخوری، پرنوشی و افزایش حجم ادرار ناشی از دیابت را به طور معنی داری کاهش داده است.

جدول ۱. نتایج حاصل از مصرف ۵ هفته ای سدیم تنگستات بر تغییرات وزن بدن، غذا و مایعات مصرفی و حجم ادرار در گروههای آزمایشی را پس از پایان مدت زمان آزمایش نشان می دهد

| گروه | C (n=10) | D (n=10) | FRD (n=10) | TDB (n=10) | T C (n=10) | TDA (n=10) |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| وزن بدن (g) | 378.25 ± 39.65 | 314.45 ± 48.61 | 283.16 ± 25.66 | 270.48 ± 31.28 | 350.48 ± 31.28 | 321.98 ± 24.12 |
| غذای مصرفی (g/day) | 35.48 ± 5.26 | 62.79 ± 10.28 | 21.74 ± 8.56 | 23.43 ± 9.12 | 23.75 ± 3.62 | 54.79 ± 4.2 |
| مایعات مصرفی (ml/day) | 50.38 ± 7.55 | 378.56 ± 29.63 | 158.82 ± 31.42 | 79.73 ± 9.18 | 41.25 ± 5.91 | 377.45 ± 28.62 |
| حجم ادرار (ml/day) | 46.66 ± 8.46 | 351.32 ± 38.27 | 141.39 ± 28.85 | 68.45 ± 11.23 | 38.76 ± 1.38 | 337.98 ± 5.38 |

مقادیر در هر گروه بصورت $Mean \pm SE$ محاسبه شده اند. C = کنترل، D = دیابتی درمان نشده، FRD = دیابتی تحت رژیم غذایی، دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات به مدت یک هفته پیش از القا دیابت تا پایان دوره آزمایش (هفته پنجم) = TDB، کنترل سالم تحت درمان با سدیم تنگستات = TC، دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات از یک هفته پس از القا دیابت تا هفته پنجم = TDA.

(هفته ۱- یک هفته پیش از تزریق STZ و زمان شروع اعمال سدیم تنگستات در گروه TDB است. هفته صفر زمان تزریق STZ در رت های دیابتی است. $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل.

$P < 0.01$ در مقایسه با گروههای دیابتی

تغییرات سطح گلوکز و انسولین

تغییرات غلظت گلوکز خون رتھای گروههای شاهد و دیابتی در هفته‌های مختلف در جدول ۲ بیان شده است. یک هفته پس از تزریق STZ مقدار گلوکز خون گروههای TDA، D و FRD نسبت به حیوانات کنترل افزایش معنی داری نشان

می‌دهد ($p < 0.01$) و در TDB مقدار گلوکز خون گروه TDB نسبت به گروه TDA، D و FRD کاهش معنی داری دیده می‌شود ($p < 0.01$). در پایان دوره آزمایش نیز اختلاف معنی داری بین گلوکز خون گروههای دیابتی TDA، D و FRD نسبت به حیوانات کنترل و TDB دیده می‌شود ($p < 0.01$).

جدول ۲. نتایج حاصل از مصرف سدیم تنگستات بر غلظت گلوکز خون (mg/dl) رتھای کنترل و دیابتی نشان داده شده است

| گروه | گلوکز خون (mg/dl) | | | | | | |
|-----------|-------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | هفته ۱ | هفته ۰ | هفته ۱ | هفته ۲ | هفته ۳ | هفته ۴ | هفته ۵ |
| C (n=10) | ۷۸,۲۵ ± ۱,۳ | ۸۳,۷۸ ± ۰,۹۴ | ۸۶,۴۵ ± ۱,۵ | ۸۲,۴۹ ± ۱,۷ | ۸۸,۷۵ ± ۱,۱۸ | ۷۵,۴۲ ± ۰,۸۷ | ۸۲,۵۵ ± ۱,۶۱ |
| D (n=10) | ۸۰,۵۱ ± ۱,۸ | ۸۲,۴۸ ± ۱,۳۵ | ^a ۲۷۱,۲۱ ± ۳,۰۵ | ^a ۲۸۳,۳۲ ± ۳,۳۴ | ^a ۲۹۱,۷۸ ± ۲,۹۷ | ^a ۲۹۸,۳۳ ± ۳,۵۵ | ^a ۳۰۶,۸۹ ± ۳,۹۸ |
| FRD(n=10) | ۷۵,۳۲ ± ۱,۴۸ | ۷۹,۵۱ ± ۱,۰۳ | ^a ۲۶۳,۴۲ ± ۳,۴۵ | ^a ۲۸۱,۱۳ ± ۳,۲۱ | ^a ۲۹۸,۳۵ ± ۳,۸۳ | ^a ۲۹۶,۵۷ ± ۲,۷۲ | ^a ۲۹۰,۴۴ ± ۳,۵۵ |
| TDB(n=10) | ۸۰,۱۹ ± ۱,۲۲ | ۸۳,۴۲ ± ۱,۳۲ | ^b ۱۳۱,۴۶ ± ۱,۷۴ | ^b ۹۵,۴۵ ± ۱,۷ | ^b ۸۷,۳۹ ± ۱,۹۸ | ^b ۸۱,۸۶ ± ۲,۰۱ | ^b ۸۵,۳۹ ± ۲,۲۹ |
| TC(n=10) | ۸۳,۹۱ ± ۱,۲۸ | ۸۵,۲۹ ± ۱,۸۴ | ۸۲,۷۸ ± ۱,۰۹ | ۸۷,۶۳ ± ۱,۲۴ | ۸۴,۲۵ ± ۲,۱ | ۸۴,۷۴ ± ۰,۸۸ | ۸۴,۷۰ ± ۱,۶۸ |
| TDA(n=10) | ۸۳,۵۶ ± ۱,۳۲ | ۸۴,۲۸ ± ۱,۷۱ | ^a ۲۵۶,۰۳ ± ۳,۷۴ | ^a ۲۶۲,۶۴ ± ۳,۸ | ^a ۲۶۸,۴۷ ± ۳,۹ | ^a ۲۷۵,۵۶ ± ۲,۸ | ^a ۲۸۰,۹۱ ± ۳,۳۳ |

مقادیر بصورت Mean±SE محاسبه شده اند. C = کنترل، D = دیابتی درمان نشده، FRD = دیابتی تحت رژیم غذایی، TDB = تنگستات به مدت یک هفته پیش از القا دیابت تا پایان دوره آزمایش (هفته پنجم)، TC = دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات (یک هفته پس از القا دیابت تا هفته پنجم) = TDA.

هفته ۱ - یک هفته پیش از تزریق STZ و زمان شروع اعمال سدیم تنگستات در گروه TDB است. هفته صفر زمان تزریق STZ در رتھای دیابتی است.

^a P < 0.01 در مقایسه با گروه کنترل

^b P < 0.01 در مقایسه با گروههای دیابتی و تحت رژیم

TDB در مقایسه با گروههای D، TDA و FRD کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.01$) و قابل مقایسه با گروههای کنترل بود ($p > 0.05$). غلظت TBARS در پانکراس نیز در گروه TDB در مقایسه با گروه D، TDA و FRD کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0.01$). در حالی که بین گروههای کنترل و TDB اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). افزایش غلظت FeII خون و پانکراس در گروه TDB در مقایسه با گروههای D، TDA و FRD معنی دار بوده ($p < 0.01$) و قابل مقایسه با گروههای کنترل است (جدول ۳).

غلظت انسولین خون در حیوانات کنترل و دیابتی در نمودار ۱ نشان داده شده است. مقدار انسولین خون همه گروههای دیابتی D، TDA، FRD و TDB نسبت به گروههای کنترل در دوره آزمایش کاهش نشان می‌دهد. در این بین درمان سدیم تنگستات موجب کاهش معنی دار انسولین خون در گروه TDB نسبت به گروههای D، TDA و FRD می‌شود ($p < 0.01$).

تغییرات قدرت اکسیدانی و آنتی اکسیدانی

پس از پایان دوره آزمایش غلظت TBARS خون در گروه

جدول ۳. نتایج حاصل از مصرف سدیم تنگستات بر غلظت TBARS و FRAP را در خون و پانکراس حیوانات کنترل و دیابتی

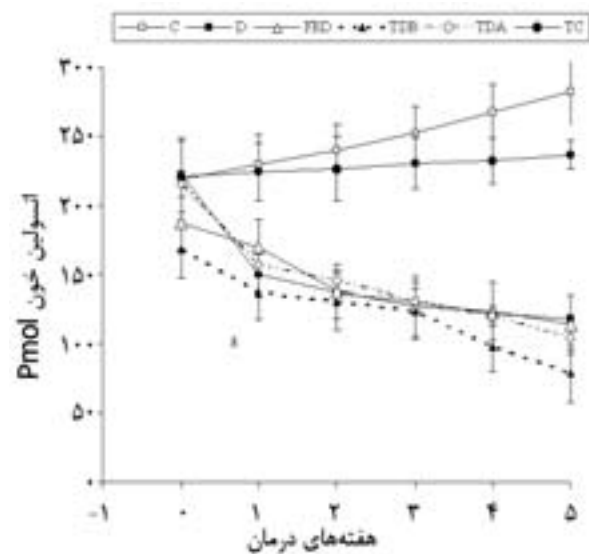
| گروه | TBARS (nmol/mg protein) | | FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{\text{II}}$ /mg protein) | |
|--------------|-------------------------|------------------------|--|------------------------|
| | خون | پانکراس | خون | پانکراس |
| C (n = 10) | ۰,۷۶±۰,۰۴ | ۰,۴۱±۰,۰۶ | ۰,۲۶±۰,۰۴ | ۰,۹۸±۰,۰۷ |
| D (n = 10) | ^a ۱,۰۳±۰,۰۹ | ^a ۱,۰۸±۰,۰۷ | ^a ۰,۱۱±۰,۰۳ | ^a ۰,۳۷±۰,۰۴ |
| FRD (n = 10) | ^a ۰,۹۶±۰,۰۸ | ^a ۱,۰۴±۰,۰۵ | ^a ۰,۳±۰,۰۲ | ^a ۰,۴۶±۰,۰۳ |
| TDB (n = 10) | ^b ۰,۷۹±۰,۰۵ | ^b ۰,۴۸±۰,۰۳ | ^b ۰,۲۲±۰,۰۲ | ^b ۰,۸۲±۰,۰۶ |
| TC (n = 10) | ۰,۶۳±۰,۰۷ | ۰,۳۵±۰,۰۵ | ۰,۳۱±۰,۰۵ | ۰,۹۵±۰,۰۴ |
| TDA (n = 10) | ^a ۰,۹۷±۰,۰۴ | ^a ۱,۰۱±۰,۰۳ | ^a ۰,۱۴±۰,۰۲ | ^a ۰,۴۲±۰,۰۳ |

کنترل = C، دیابتی درمان نشده = D، دیابتی تحت رژیم غذایی = FRD، دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات (به مدت یک هفته پیش از القا دیابت و در طول دوره آزمایش) = TDB، کنترل تحت درمان با سدیم تنگستات = TC، دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات (از یک هفته پس از القا دیابت) = TDA. (هفته ۱ - یک هفته پیش از تزریق STZ و زمان شروع اعمال سدیم تنگستات در گروه TDB است. هفته صفر زمان تزریق STZ در رتهای دیابتی است. $P < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل.

$P < 0.01$ در مقایسه با گروههای دیابتی و FRD.

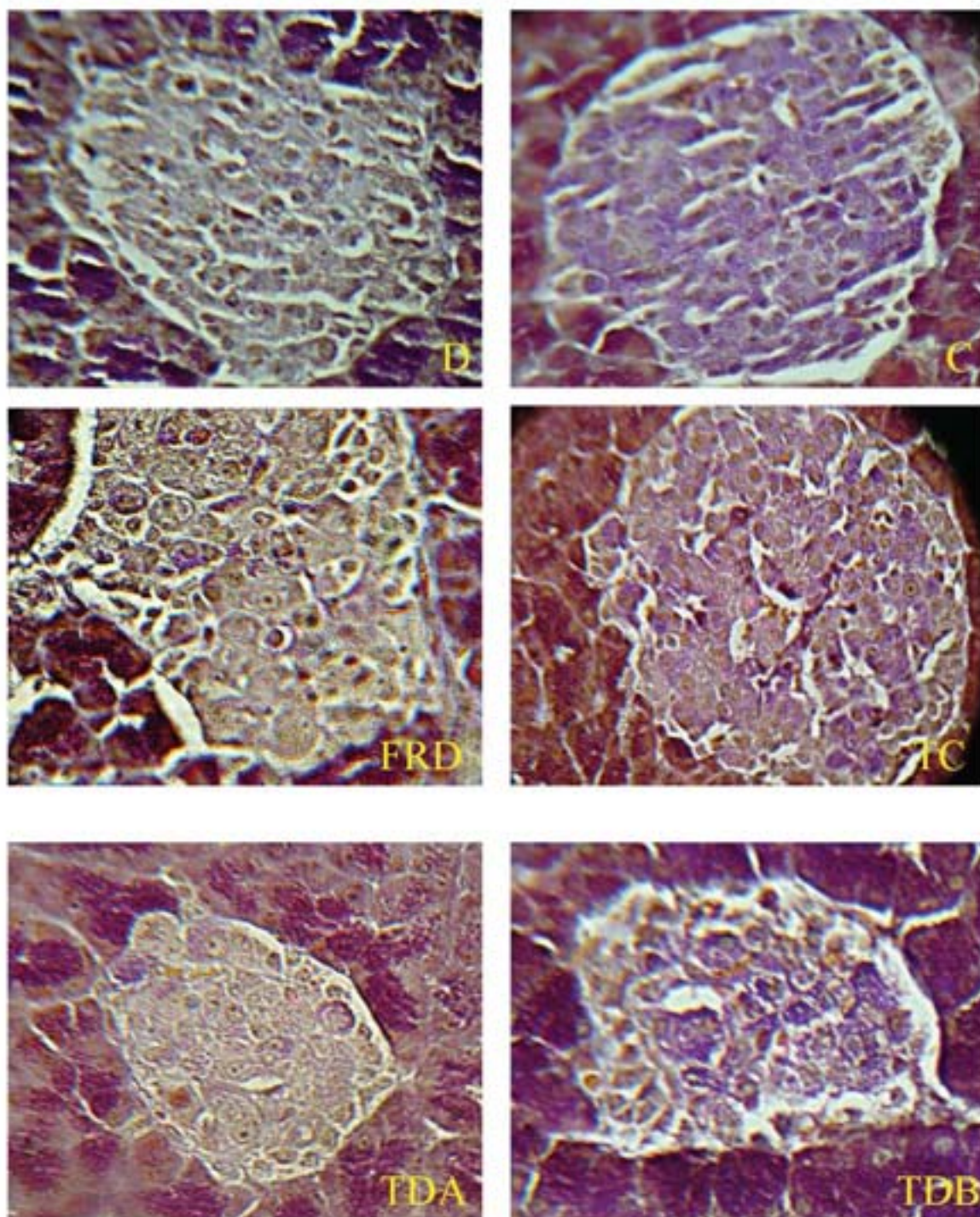
یافته‌های بافت شناسی

مطالعه هیستوشیمی مقاطع بافتی نشان داد که در مقاطع پانکراس مربوط به گروههای کنترل C و TC میان آسینوسهای اگزوکرینی پانکراس جزایر لانگرهانس با سلولهای بتای فراوان که با آلدیاید فوشین به رنگ بنفش ارغوانی رنگ گرفته اند باعث بنفش شدن نمای کلی جزایر شده است. در محیط جزیره سلولهای آلفا به رنگ زرد مشاهده می‌شوند. در مقطع پانکراس رت گروه دیابتی D، FRD و TDA نمای کلی جزایر لانگرهانس تغییر واضحی نموده است. عدم حضور رنگ پذیری بنفش واضح نسبت به آلدیاید فوشین به علت تخریب سلولهای بتا، موجب شده جزایر ترجیحا رنگ زرد مربوط به سلولهای آلفا را نشان دهند و نمای تحلیل رفته داشته باشند. در مقطع پانکراس رت گروه TDB و فور نسبی سلولهای بتا که با آلدیاید فوشین به رنگ بنفش ارغوانی رنگ گرفته‌اند نمای کلی جزیره را تا حد زیادی مشابه گروه کنترل ساخته است و نشانگر حفاظت سلولهای بتا از آسیب اکسیداتیو ناشی از استرپتوزوتوسین است (شکل ۱).



نمودار ۱. نتایج حاصل از مصرف سدیم تنگستات بر غلظت انسولین.

کنترل = C، دیابتی درمان نشده = D، دیابتی تحت رژیم غذایی = FRD، دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات (به مدت یک هفته پیش از القا دیابت و در طول دوره آزمایش) = TDB، کنترل تحت درمان با سدیم تنگستات = TC، دیابتی تحت درمان با سدیم تنگستات (از یک هفته پس از القا دیابت) = TDA. هفته صفر زمان تزریق STZ در رتهای دیابتی است.



شکل ۱. مقطع پانکراس رت گروههای دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین (D)، کنترل (C)، رژیم غذایی (FRD)، کنترل تحت درمان (TC)، درمان با سدیم تنگستات یک هفته بعد از القاء دیابت (TDA) و درمان با سدیم تنگستات یک هفته قبل از القاء دیابت (TDB) - درشت نمایی ۴۰۰- رنگ آمیزی آلهاید فوشین تغییر یافته. در جزیره لانگرهانس سلولهای بتا به رنگ بنفش ارغوانی و سلولهای آلفا به رنگ زرد مشاهده می شوند.

بمط

نتایج مطالعه حاضر به روشنی نشان داد که کاربرد سدیم تنگستات قبل از تزریق استرپتوزوتوسین می‌توند باعث حفاظت سلولهای بتا از استرس اکسیداتیو شده و از دیابت جلوگیری نماید. سایر محققین اثرهای درمانی اصلاح عنصر تنگستن را در مدل‌های مختلف بیماری دیابت تیپ I و II اثبات کرده اند و نشان داده اند که تنگستن می‌تواند فعالیت‌های شبه انسولینی را تقلید نماید [۲۶-۲۴]. همچنین اصلاح متابولیسم گلوکز کبدی و طبیعی شدن گلیسمیا از طریق اعمال خوراکی تنگستات در رت‌های دیابتی القا شده توسط استرپتوزوتوسین [۲۵]، تصحیح‌هایپرگلیسمی در مدل‌های دیابتی وابسته به انسولین و مستقل از انسولین طی درمان‌های طولانی مدت و هموستاز گلوکز توسط این عنصر [۲۶]، گزارش شده است. مطالعات تحت شرایط *in vitro* و در کشت هیپاتوسیتها عملکرد شبه انسولینی این عنصر را از طریق افزایش سنتز و تجمع گلیکوژن، و بدون ایجاد اثرهای سمی بر کشت هیپاتوسیتها یا نمونه‌های سلولی نشان می‌دهد [۲۷]. نشان داده شده است که استرپتوزوتوسین سبب ایجاد نقص در اکسیداسیون گلوکز [۳۹] و کاهش بیوسنتز و ترشح انسولین [۴۰] می‌شود. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که کاربرد سدیم تنگستات (۱mg/ml) قبل از تزریق استرپتوزوتوسین سبب کاهش قابل ملاحظه گلوکز پلاسما ($p < 0.01$) شد. مطالعات سایر محققین که از مشتق تنگستات در غلظت‌های مشابه به عنوان آب آشامیدنی و در یک دوره طولانی، به صورت *in vivo* و به منظور درمان دیابت استفاده کرده اند [۲۶] در مقادیر بیشتر و زمان‌های طولانی، بهبود علائم دیابت را سبب شده است. پیش‌درمانی با یون تنگستات در TDB توانست سبب کاهش پرنوشی، پر ادراری و پرخوری (که از نشانه‌های دیابت تیپ I درمان نشده هستند) شود. کاهش پرنوشی و پلی‌اوری ناشی از مصرف یون تنگستات در غلظت‌های مختلف

توسط پژوهشگران در زمان‌های طولانی مدت گزارش شده است. مصرف یون تنگستات در گروه TDB سبب کاهش معنی دار سطح انسولین پلاسما ($p < 0.01$) شده است. یافته‌های این پژوهش با سایر گزارش‌های مبنی بر کاهش انسولین در گروه دیابتی و همچنین عدم افزایش معنی دار انسولین در رت‌های دیابتی تحت درمان طولانی مدت همخوانی دارد [۲۶]. کاهش انسولین در گروه دیابتی تحت درمان (TDB) خود نشان دهنده صدق این ادعاست که افزایش پاسخ دهی بافتها به هورمون انسولین در حضور تنگستن افزایش می‌یابد. به نحوی که پیش‌درمانی با سدیم تنگستات قادر است از کاهش عملکرد انسولین در مدل‌های حیوانی دیابتی جلوگیری نماید. بدین ترتیب کاهش انسولین پلاسما در رت‌های دیابتی تحت درمان با یون تنگستات (TDB) از نوعی استقلال عمل تنگستن و هورمون انسولین خبر می‌دهد.

شواهد نشان می‌دهد که استرپتوزوتوسین می‌تواند گونه‌های اکسیژن بسیار فعال ROS تولید کند. این رادیکال‌های آزاد بسیار مخرب بوده و سبب گسیختگی یا شکست DNA خواهد شد که نتیجه آن ایجاد تغییرات زیان بار در سلول‌های بتاست [۳۲]. مطالعات نشان داده است که برخی عوامل فارماکولوژیکی قادرند سلول‌های بتا را در دیابت نوع I محافظت کرده و موجب بهبود موقت یا حتی دائمی دیابت شوند [۳۳]. تحقیقات پژوهشگران در موارد حفاظت از دیابت نشان می‌دهد در لحظه تزریق استرپتوزوتوسین فعالیت سلول‌های بتا کم می‌شود، اما پیش‌درمانی رت‌ها با انسولین آگزوژن به مدت ۵ روز، با حفاظت محتوای انسولین پانکراسی باعث جبران عملکرد دیابتوژنیک استرپتوزوتوسین می‌شود [۳۷]. از طرفی افزایش فعالیت متابولیکی در جزایر پانکراس موش همراه با غلظت بالای گلوکز، حساسیت سلول‌های بتا را نسبت به STZ تشدید و تایید می‌کند [۴۱]. تحقیقات نشان داده است که سدیم تنگستات دارای خواص شبه انسولینی است [۲۵] و به

نظر می‌رسد این ترکیب با کاهش فعالیت سلولهای بتا در زمان تزریق STZ مانع از تخریب این سلولها شود. هنگامی که درمان با سدیم تنگستات پس از تزریق STZ آغاز می‌شود، تخریب سلولهای بتا در اثر تزریق STZ در ابتدا رخ داده است و درمان کوتاه مدت با دوز پایین (۱-۱/۷۵mg/ml) اعمال شده در این مطالعه نمی‌تواند آسیب ناشی از تزریق STZ را در حد متعادلکننده ای ترمیم نماید. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پیش درمانی با سدیم تنگستات موجب بهبود افزایش قند خون و اصلاح متابولیسم گلوکز کبدی در رتهای دیابتی TDB خواهد شد که می‌تواند به دلیل خواص شبه انسولینی تنگستات [۲۳] و به دنبال آن فرایند نوزایی (Restoration) سلولهای بتا باشد [۲۹]. برخی از محققین براین اعتقادند که اثرمشتقات مختلف تنگستن در کاهش گلوکز خون که نتیجه تصحیح فرآیندهای متابولیسمی است صرفاً به خاطر کاهش وزن ناشی از کاهش اشتها است. به عبارتی به نظر می‌رسد که در نتیجه افزایش جذب گوارشی، هیپرگلیسمی اصلاح می‌شود. رد این مدعا از سایر نتایج به دست آمده در این مطالعه قابل استنباط است. در این سری از آزمایشها مدل‌های دیابتی تیپ I درمان شده با سدیم تنگستات (TDB) به همراه یک گروه دیابتی (FRD) که سعی شده تا با اعمال محدودیت غذایی تقریبی و تجربی وزن شان در حد وزن رتهای دیابتی که یون تنگستات مصرف نموده اند باشد مورد استفاده قرار گرفته است. تحت این شرایط نتایج به دست آمده نشانگر بی تاثیر بودن رژیم غذایی بر کاهش گلوکز خون و تصحیح متابولیسم کربوهیدراتها در مدل‌های دیابتی است. در راستای این یافته، سایر محققین نیز گزارش کرده اند که محدودیت غذایی تاثیر قابل توجهی بر متابولیسم گلوکز کبدی در رتهای دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین ندارد [۴۲ و ۴۳]. نتایج این آزمایش تایید می‌کند که بهبود هیپرگلیسمی در رتهای دیابتی درمان شده با سدیم تنگستات هیچ رابطه ای با

مصرف رژیم محدود شده غذایی ندارد. از طرفی این ادعا که مصرف تنگستات و ویژگیهای شبه انسولینی آن موجب اصلاح متابولیسم گلوکز کبدی خواهد شد نیز تایید می‌شود. نتایج این تحقیق بیانگر این نکته است که پیش درمانی با سدیم تنگستات در رتهای دیابتی در مقایسه با رتهای D و TDA موجب حفاظت خون و پانکراس در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود. در بیماران مبتلا به دیابت کنترل نشده یا با کنترل ناقص و حیوانات دیابتی القا شده توسط استرپتوزوتوسین افزایش قند خون و استرس اکسیداتیو مشاهده می‌شود [۴۴ و ۴۵]. هیپرگلیسمی حاد و مزمن موجب القای استرس اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها خواهد شد [۴۵]. افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدها همراه با افزایش رادیکالهای پراکسی و هیدروکسیل موجب القای آسیبهای اکسیداتیو می‌شود [۴۶]. به عبارتی پراکسیداسیون لیپید یکی از علایم دیابت مزمن و کنترل نشده است. رایج ترین نشانگر کاربردی در تشخیص پراکسیداسیون لیپیدها، TBARS است [۴۷]. در این تحقیق افزایش معنی داری در غلظت TBARS خون و هموژنه پانکراس رتهای D و TDA در مقایسه با رتهای کنترل دیده شد. پیش درمانی با سدیم تنگستات سبب کاهش معنی دار TBARS خون و هموژنه پانکراس رتهای دیابتی درمان شده TDB نسبت به رتهای گروههای FRD، D، و TDA شده است. استرس اکسیداتیو در دیابت ملیتوس همواره با کاهش قدرت آنتی اکسیدانی همراه است [۴۸]. شواهد نشان می‌دهد که میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی FRAP در پلاسمای حیوانات مبتلا به دیابت مزمن در مقایسه با حیوانات کنترل کاهش معنی داری نشان می‌دهد [۴۹]. نتایج این تحقیق نیز به طور مشابهی نشان می‌دهد که بین FRAP خون و هموژنه پانکراس رتهای دیابتی در مقایسه با حیوانات کنترل کاهش معنی داری وجود دارد. پیش درمانی با سدیم تنگستات موجب افزایش قدرت آنتی اکسیدانی

رت‌های دیابتی درمان شده نسبت به گروه‌های D، FRD و TDA می‌شود. استنباط محققان حاضر از این نتایج این است که سدیم تنگستات می‌تواند موجب افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی یا کاهش استرس اکسیداتیو یا هردو مورد درخون و پانکراس رت‌های دیابتی درمان شده شود. بنابراین تنگستات مانع از آسیب ناشی از استرپتوزوتوسین بتا سل‌های پانکراسی خواهد شد. هنگامی که سلول‌های بتا بر اثر تزریق اولیه استرپتوزوتوسین می‌میرند (گروه TDA) به نظر می‌رسد که درمان کوتاه مدت و با دوز پایین سدیم تنگستات نمی‌تواند این آسیب را به طور کامل ترمیم نماید، و هیپرگلیسمی و استرس اکسیداتیو القا شده توسط STZ برای پانکراس، کبد و کلیه‌ها و سایر اندام‌های بدن خطرناک خواهد بود. مطالعات دیگر نیز نشان می‌دهد که تنگستات موجب نرمال شدن گلیسمیا در رت‌های دیابتی می‌شود [۲۵، ۲۶ و ۳۰]. در این پژوهش‌ها دوزهای بالاتر سدیم تنگستات (بیش از ۲ mg/ml)، با دوره‌های درمانی طولانی (حداقل ۶۰ روز)، در رت‌های چاق ZDF، یا رت‌های نئوناتال دیابتی القا شده توسط STZ اعمال شده است. در این پژوهش‌ها اغلب بر عملکرد شبه انسولینی تنگستات در نرمال سازی گلیسمیا تاکید شده است؛ اما مطالعه حاضر بیشتر بر آثار محافظتی تنگستات در سلول‌های بتا متمرکز است. تحقیقات نشان می‌دهد که در رت‌های ویستار نر، سدیم تنگستات می‌تواند در برابر آسیب ناشی از مواجهه با پرتو گاما کبالت ۶۰ (Co 60) اثرهای رادیوپروتکتیو اعمال نماید [۵۰]. در مطالعه دیگری که روی رت‌های دیابتی القا شده توسط STZ انجام شده است، سدیم تنگستات (۲ mg/ml) در آب آشامیدنی (طی ۸ ماه موجب کاهش سطح گلوکز سرم، ممانعت از ایجاد تغییرات مورفولوژیکی القا شده توسط دیابت در کلیه و چشم و نیز کاهش میزان مرگ و میر شده است. از آنجایی که هیچ‌گونه حالت هیپوگلیسمی یا اثرهای جانبی نامناسبی چه در رت‌های دیابتی تحت درمان و چه در

رت‌های سالم تحت درمان ذکر نشده است، پس نتایج بیانگر این مدعاست که استفاده از تنگستات به عنوان یک درمانی طولانی مدت برای بیماری دیابت مطرح است [۲۶]. ارزیابی هیستوپاتولوژیکال مقاطع پانکراس افزایش تعداد سلول‌های بتای موجود در رت‌های درمان شده با سدیم تنگستات TDB در مقایسه با رت‌های دیابتی D، FRD و TDA را نشان می‌دهد. در این تحقیق مشخص شد که با وجود اینکه تنگستات نمی‌تواند به طور کامل سلول‌های بتا را در برابر سیتوتوکسیسیته ناشی از STZ محافظت کند اما می‌تواند به طور نسبی و تا حد زیادی سلول‌های بتا را محافظت نماید. عناصری از قبیل ترکیبات و کمپلکس‌های وانادیوم نیز طی روندی مشابه حفاظت از سلول‌های بتا را در رت‌ها دیابتی شده ناشی از استرپتوزوتوسین نشان داده اند [۵۱]. نهایت آنکه یک هفته پیش درمانی با تنگستات مانع از ایجاد دیابت شده از طرفی حفاظت سلول‌های بتا در بیماری دیابت در نتیجه آثار شبه انسولینی تنگستات در زمان تزریق استرپتوزوتوسین است. همچنین نشان داده شده است که تغییر فنوتیپ دیابت در رت‌های n-STZ (دیابت نوع II) تحت درمان با سدیم تنگستات، در نتیجه افزایش تعداد سلول‌های بتا از طریق نوزایی (Neogenesis) و طولانی شدن مدت باز زایی (Regenerative) است [۲۳]. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پیش درمانی با سدیم تنگستات سبب بهبود گلیسمیا و استرس اکسیداتیو و مانع زوال هیستوپاتولوژیکی سلول‌های بتای پانکراس در رت‌های دیابتی نوع I القا شده توسط STZ می‌شود. سدیم تنگستات با کاهش استرس اکسیداتیو القاء شده STZ و کاهش ترشح انسولین یا هر دو عامل سلول‌های بتای پانکراس را محافظت می‌نماید. بر این اساس پیش درمانی کوتاه مدت با تنگستات می‌تواند با حفظ نسبی تعداد سلول‌های بتای گرانول دار، به قدر کافی نرموگلیسمی را حفظ می‌کند که روند پیشرفت دیابت را معکوس کند. بنابراین ایجاد حالت نرموگلیسمی در نتیجه

مطالعات بیشتری لازم است تا اثرهای مفید درمانی سدیم تنگستات در بیماران دیابتی مشخص شود.

تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زاهدان که هزینه انجام طرح را تامین نموده اند تشکر و قدردانی می‌شود.

افزایش عملکرد انسولین و کاهش فعالیت متابولیک سلولهای بتا و حذف و دفع رادیکالهای آزاد که ممکن است موجب کاهش پراکسیداسیون لیپید شود، مانع از آسیب پانکراس می‌شود. در نهایت اینکه افزایش و ایجاد اثرات شبه انسولینی تنگستات نه تنها با کاهش گلوکز خون همراه است بلکه ممکن است با اثر مستقیم بر سلولهای بتای پانکراس نیز همراه شود. در این رابطه

References

1. **Kuzuza T, Nakagawa S, Kanazawa Y, Iwamota Y.** Report of the committee on the classification and diagnosis criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Prac* 2002; 55: 65-85.
2. **Puavilai G, Chanprasertyotin S, Sriphrapadaeng A.** Diagnostic criteria for diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance: 1997 criteria by the expert committee on the diabetes and classification of diabetes mellitus (ADA) , 1998,WHO consultation criteria and 1985 WHO criteria . *Diabetes Res Clin Prac* 1999; 44: 21-26.
3. **Wei M., Gaskill SP., Haffner SM.** And Stern MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all cause and cardiovascular mortality. *Diabetes care.* 1998; 21(7): 1167-1172.
4. **Oberley LW.** Free radicals and diabetes, *Free Rad. Biol Med* 1988; 5: 113-24.
5. Baynes JW. Role of oxidative stress in the development of complication in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-12.
6. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: S5-20.
7. **Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-20.
8. **Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM.** Oxidative stress and stress-activated signaling pathways : a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Rev* 2002; 23: 599-622.
9. **Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB.** Diabetes, oxidative stress and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
10. **Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J.** Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* 1998; 94: 623-32.
11. **Grankvist K, Marklund SL, Taljedall B.** CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathionr peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 1981; 199: 393-8.
12. **Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M.** Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:463-6.
13. **Ho E, Bray TM.** Antioxidants, NFkB activation and diabetogenesis. *Pol Soc Exp Biol Med* 1999; 22: 205-13.
14. **Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagawa Y, Yamada T.** Streptozotocin and alloxan induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. *Diabetes* 1999; 40: 1141-5.
15. **Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG.** The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes* 1981; 30: 235-41.
16. **Kaneto H, Fujii J, Seop HG, Suzuki K, Matsuoka T, Nakamura M, et al.** Apoptotic cell

- death triggered by nitric oxide in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1995 ; 44 : 733-8.
17. **Enghofer M, Usadel KH, Beck O, Kusterer K.** Superoxide dismutase reduced islet microvascular injury induced by streptozotocin in the rat. *Am J Physiol* 1997; 273: 376-82.
 18. **Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H.** Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly (ATP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981; 294: 284-6.
 19. **Brichard SM, Henquin JC.** The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol Sci* 1995; 16: 265-9.
 20. **Rossette L, Giaccaria A, Klrin RE, Vogel LR.** Insulinomimetic properties of trace elements and characterization of their in vivo mode of action. *Diabetes* 1990; 39: 1243-50.
 21. **Gao LH, Liu WP, Wang BL.** Effects of bis (alpha-furancarboxylato) oxovanadium (IV) on non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chem Acta* 2006; 368: 173-8.
 22. **Harati M, Ani M.** Vanadyl sulfate ameliorates insulin resistance and restores plasma dehydroepiandrosterone-sulfate levels in fructose-fed, insulin resistant rats. *Clin Biochem* 2004; 37: 694- 97.
 23. **Fernandez AJ, Barbera A, Nadal B, Barcelo BS, Piquer S, Claret M, Guinovart JJ, Gomis R.** Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate. *Diabetes* 2004; 47: 470-7.
 24. **Cam CM, Rodrigues BH, McNeill J.** Distinct glucose lowering and beta cell protective effects of vanadium and food restriction in streptozotocin – diabetes. *Europ Endocrinol* 1999; 141: 546-54.
 25. **Barbera A, Rodrigues-Gil JE, Guinovart JJ.** Insulin-like actions of Tungstate in diabetic rats, Normalization of hepatic glucose metabolism . *Biol Chem* 1994; 269(31): 20047-53.
 26. **Carmen Munoz M, Barbera A, Domingues J, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Guinovart JJ.** Effects of Tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker Fatty Rats. *Diabetes* 2001; 50: 131-8.
 27. **Domingues JE, Carmen Munoz M, Zafra D, Sanchez-Perez I, Baque S, Caron M, et al.** The antidiabetic agent sodium tungstate activates Glycogen Synthesis through an Insulin Receptor-independent Pathway. *Biol Chem* 2003; 278: 4278594.
 28. **Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K.** Prevention of type 1 diabetes: from the view point of β cell damage. *Diabetes Res Clin Prac* 2004; 66: S27- 32.
 29. **Hassid WZ, Abrahams S.** Chemical procedure for analysis of polysaccharides. In: *Methods in enzymology*. Edited by Colowick SP, Kaplan NO. New York, CA: Academy press CO, 1966, pp 34-37.
 30. **Barbera A, Fernandez-Avarez J, Truce A, Gomis R, Guinovart JJ.** Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycemia. *Diabetologia* 1997; 40: 143-9.
 31. **Burring JM, Price CP.** Measurement of blood glucose. *Ann Clin Biochem* 1985; 22: 327-42.
 32. **Oranje WA, Roundas C.** Lipid peroxidation in type 2 diabetes: Relationship with macrovascular disease? *Neth J Med* 1999; 53(2): 61-8.
 33. **Yagi K.** Simple procedure for specific assay of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Free Radic Antiox Protoc* 1998; 108: 101-6.
 34. **Jain SK, Levine SN.** Elevated lipid peroxidation and vitamin E-quinon levels in heart ventricles of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 337- 41.
 35. **Benzie IFF, Strain JJ.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochem* 239; 1996: 70-6.
 36. **Benzie IFF, Strain JJ.** The ferric reducing/antioxidant power: Direct measured of the total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simulations measurement of total antioxidant power and ascorbic acid

- concentration. *Med Enzymol* 1999; 299: 15-27.
37. **Lowery OH, Rosebrough NN, Far AL, Randall RJ**, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1952; 193: 265-75.
 38. **Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological technique.** 5th edition, Churchill Livingstone, London, 2002, pp 556-557, 364.
 39. **Bolaffi JL, Nagamatsu S, Harris J, Grodsky GM.** Protection by thymidine, an inhibitor of polyadenosine diphosphate ribosylation of streptozotocin inhibition of insulin secretion. *Endocrinol* 1987; 120: 2117-22.
 40. **Nakatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J.** Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 1990; 127: 161-5.
 41. **Eiziric DL, Strandell S, Sandler S.** Culture of mouse pancreatic islets in different glucose concentrations modifies β cell sensitivity to streptozotocin. *Diabetologia* 1988; 31: 51-7.
 42. **Reul BA, Amin SS, Buchet JP, Ongema LN, Crans DC, Brichard SM.** Effects of vanadium complex with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *British J Pharmacol* 1999; 126: 467-77.
 43. **Becker DJ, Reul BA, Ozcelicay AT, Buchet JP, Henquin JC, Brichard SM.** Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reserves abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia* 1996; 39: 3-11.
 44. **Vijayakumar M, Govindrajan R, Rao GMM, Rao CV, Shirwaikar A, Mehrota S, et al.** Action of *Hygrophila auriculata* against streptozotocin-induced oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 2006; 104: 356-61.
 45. **Baynes LW, Thorpe SR.** Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
 46. **Levy U, Zaltzber H, Ben-Amotz A, Kanter Y, Aviram M.** β -carotene affects antioxidant status in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pathophysiol* 1999; 6: 157-61.
 47. **Motilla PL, Vargas JF, Tunez IF, Munoz De Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES.** Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: preventive effects of melatonin. *J Pineal Res* 1998; 25: 94-100.
 48. **Seghrouchi I, Dari J, Bannier E., Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A,** Oxidative stress parameters in type I , type II and insulin-treated tpe 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficacy, *Clin Chim Acta* 2002; 321: 89-96.
 49. **Cakatay U, kayali R.** The evaluation of altered redox status in plasma and mitochondria of acute and chronic diabetic rats, *Clin Biochem.* 2006; 39: 907-12.
 50. **Sato K, Ichimasa M, Miyahara K, Shiomi M, Nishimura Y, Ichimasa Y.** Radioprotective effects of sodium tungstate on hematopoietic injury by exposure to ^{60}Co gamma rays in Wistar rats. *J Radiat Res* 1999; 40(2): 101-13.
 51. **Ramachandran B, Ravi K, Narayanan V, Kandaswamy M, Subramanian S.** Protective effect of macrocyclic binuclear oxovanadium complex on oxidative stress in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Chem Biol Intract* 2004; 149: 9-21.