اثر محافظتی پپتیدهای جداسازی شده از مغز پسته بر پارامترهای بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک در کلیه موش های صحرایی نر نژاد ویستار دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

مهسا رنجبر، فاطمه باقری، زهرا باقری حسین آبادی، الهام جعفری، ناهید عسکری،سوده خنامانی فلاحتی پور

۱-دانشجوی پزشکی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۲-دکتری مهندسی کشاورزی-گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۳- استادیار بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
۴-دانشیار آسیب شناسی، مرکز تحقیقات پاتولوژی و سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۵-استادیار ژنتیک مولکولی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کرمان
۶- دانشیار ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات سلامت پسته، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

Email: (mahsaranjbar750424@gmail.com)
Email: (Fatemeh.baghery711@gmail.com)
Email: (Baghery.zahra@yahoo.com)
Email: (ejfarda@yahoo.com)
Email: (nahidaskari@gmail.com)
Email: (s.falahatipour@rums.ac.ir)

چکیده

بخشهای مختلف پسته منابع غنی برای داروهای بیومولکولی هستند و طبق مطالعات، پسته قادر به مهار کردن مکانیسم دیابت است. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر هیدرولیزاتهای پروتئینی جدا شده از مغز پسته (PHPK) بر شاخصهای بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی کلیه در موشهای صحرایی دیابتی شده با STZ بود. تعداد ۹۶ سر موش صحرایی(۲۵۰گرم) بطور تصادفی به ۱۲ گروه هشت تایی تقسیم و بمدت ۸ هفته با دوزهای مختلف PHPK تغذیه شدند. در همه دوزهایPHPK، سطوح اوره و کراتینین بطور قابل توجهی کاهش و اثر بالقوه ای بر درمان دیابت ملیتوس داشت که احتمالاً با حفاظت بهتر کلیه مرتبط است.

کلمات کلیدی: هیدرولیزات های پروتیینی، پسته، دیابت، کلیه، نفروپاتی

۱. مقدمه

بیماری دیابت یکی از شایعترین اختلالات متابولیکی است که افراد زیادی را در جهان درگیر نموده است به طوریکه طبق گزارش سازمان جهانی سلامت تا سال ۲۰۱۴ تعداد ۴۲۲ میلیون فرد بالغ به این بیماری مبتلا شده اند. علاوه بر این گزارش شده است که بدون مداخله برای جلوگیری از افزایش دیابت تا سال ۲۰۴۵ تعداد بیماران به ۶۲۹ میلیون نفر خواهد رسید[1]. بیماری دیابت از طریق میزان بالای گلوکز خون (هیپرگلیسمی) تشخیص داده می شود این بیماری در نتیجه نقص در ترشح و یا عملکرد انسولین و یا هر دو ایجاد می شود[2]. این بیماری می تواند عملکرد بخش های مختلف بدن انسان را تحت تأثیر قرار دهد که در بعضی موارد کیفیت زندگی را کاهش می دهد یا حتی منجر به مرگ می شود.

دیابت به عنوان شایع ترین علت بیماری کلیوی در جهان محسوب می گردد و حدود ۴۰ درصد افرادی که مبتلا به دیابت نوع ۲ هستند دارای بیماری کلیه دیابتی هستند که با دفع پروتئین از ادرار، فشار خون بالا و کاهش ۹۰ درصدی کلیه مشخص می شود[3]. هیپرگلیسمی و دیابت می تواند باعث نفروپاتی دیابتی شود که با افزایش ترشح پروتئین در ادرار تشخیص داده می شود و میتواند یکی از مهمترین و وخیم ترین عوارض دیابت باشد که مراحل مختلفی را به خود اختصاص می دهد. اما در نهایت منجر به نقص در عملکرد کلیوی و از کار افتادن کامل کلیه ها می شود [4]. دیابت، با ایجاد تغییرات در بخش گلومرولی و توبولی کلیه ها، سبب ایجاد نفروپاتی می شود. از مهمترین آسیب های نفروپاتی دیابتی در بخش گلومرولی کلیه میتوان به اسکلروزیس، انتشار ماتریکس مزانشیال و ضخیم شدگی غشای پایه، اشاره کرد. عوامل تاثیرگذار بیوشیمیایی و مولکولی متعددی از جمله افزایش قند خون، اکسیداسیون گلوکز، گلیکوزیله شدن پروتئین ها می تواند تولید رادیکالهای آزاد به ویژه گونه های فعال اکسیژن یا ROS را القاء نماید. این شرایط نامناسب در بافت در نهایت می تواند تعادل بین تولید ROS و مکانیسم دفاعی سلول (سیستم آنتی اکسیدانی) را مختل نماید و تخریب سلول، تغییر در عملکرد سلولها و آسیب به بافتها به ویژه کلیه ها را سبب شود [5,6]. تخمین زده می شود که تقریباً ۳۰-۲۵ درصد بیماران مبتلا به دیابت نوع دو دچار نفروپاتی می شوند. میزان بروز در مبتلایان به دیابت نوع ۱ و ۲ مشابه است، اما به نظر میرسد بعضی گروه های نژادی مثل سیاهان، جنوب آسیا و بومی های آمریکایی نسبت به قفقازیها در معرض خطر بیشتری باشند [7,8].

با پیشرفت دیابت و عوارض ایجاد شده ناشی از دیابت، بیشتر بیماران به داروهای خوراکی و گاهی تزریق انسولین نیاز پیدا می کنند. از جمله این داروها می توان تولازامايد، تولبوتامید، کلروپروپامايد،گلی بورايد، گلی بن کلامید ، متفورمین و ... اشاره نمود[9]. اگرچه مکانیسم عمل بسیاری از داروهای ذکر شده در کنترل دیابت شناسایی شده است، اما متاسفانه علیرغم کارایی داروهای ذکر شده در مدیریت دیابت، این داروها منجر به آغاز علائم بالینی و عوارض جانبی متعدی از جمله تهوع، استفراغ، افزایش وزن، افزایش ریسک ابتلا به بیماری های قلبی و عروقی، غفونت پانکراس، افزایش ریسک ابتلا به سرطان کیسه صفرا می شوند [10]. از طرف دیگر احتمال می رود با مصرف داروهای ذکر شده همچنان، شیوع نفروپاتی دیابتی و به دنبال آن نارسایی کلیوی در بیماران دیابتی، زیاد باشد، لذا یافتن استراتژی درمانی موثرتر و با عوارض کمتر، ضروری به نظر میرسد.

در سال های اخیر مصرف خوراکی یا تزریقی پپتیدهای بیواکتیو، یکی دیگر از راهکارهای جدید درمانی به منظور مدیریت دیابت معرفی شده اند. از سوی دیگر طبیعی بودن این منابع، امکان بروز عوارض بالینی کمتری را فراهم می نماید. پپتیدهای

بیواکتیو، زنجیره ای کوتاه از اسیدهای می باشند که دارای فعالیت بیولوژی در بدن انسان می باشند. اثـرات ضـد میکروبـی[11]، ضد فشار خون، حمایت از سیستم عصبی، تعدیل سیستم ایمنی، آنتی ترومبوتیک[12]، آنتی اکسیدانت[13] و اثرات ضد دیـابتی از امتیازات ارزشمند استفاده از این ترکیبات عنوان شده است[14,15].

بر طبق طب سنتی پسته حاوی مقدار فراوانی از پروتئین های گیاهی، مواد نشاسته ای غنـی و مـواد معـدنی نظیـر مـس، منیزیم و پتاسیم است که می تواند تامین کننده احتیاجات بدن و خون باشد[16]. هم چنین مغز این گیاه به دلیل داشتن ترکیبات مفیدی مانند آنتی اکسیدان ها و خواص ضد التهابی قوی جهت درمان بیماریهای مختلفی از جمله فشار خون بالا، کـاهش چربـی های خون و کاهش فاکتورهای التهابی استفاده شده است. علاوه بر این اخیراً خواص درمانی پسته در بهبود روند بیمـاری دیابـت ارزیابی شده و نقش پسته در کاهش قند خون مورد تایید قرار گرفته است[17]. بسیاری از مطالعات اثر پسته در کـاهش LDL، کلسترول و افزایش HDL[18,19]، اثر محافظتی در بیماری های قلبی[20]، تغییر در متابولیسم کربوهیدرات ها و لیپیـدها و کاهش گلوکز خون را گزارش کرده اند[17]. تا کنون پپتیدهای منابع گیاهی و حیوانی مختلفی به عنوان منابع پروتئین به منظور جداسازی لیزات ها و پپتیدهای بیواکتیو مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به نقش ارزشمند این ترکیبات در کنترل قند خـون و همچنین از آنجائیکه تاکنون نقش لیزات و پپتیدهای مغز پسته در کنترل قند خون مورد بررسی قرار نگرفتـه اسـت بنـابراین در این مطالعه پس از جداسازی هیدرولیزات های پروتئینی (PHPK) موجود در پسته، بـه منظـور ارزیـابی اثـرات احتمـالی آنهـا در پیشگیری و درمان دیابت قندی، تاثیر غلظتهای مختلف PHPK را بر شاخصهای بیوشیمیایی و هیسـتوپاتولوژی بافـت کلیـه در موش های نر نژاد ویستار سالم با رژیم غذایی نرمال، موش های نر نژاد ویستار دارای رژیم غذایی پرقند و موش های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین Streptozotocin (STZ) با رژیم غذایی نرمال بررسی شد.

۲. تئوری و پیشینه تحقیق

دیابت یکی از شایعترین بیماری های غدد درون ریز محسوب می گردد که می تواند یکی از عوامل اصلی نارسایی کلیه محسـوب گردد. Molitch و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش دادند که دیابت میتواند باعث از کار افتادن کلیه شـود و بسـیاری از بیمـاران مبتلا به دیابت نیاز به دیالیز یا پیوند کلیه دارند[21]. در سال ۲۰۱۲ یک مطالعه مروری نشان داد که بیمـاری مـزمن کلیـوی در افراد دیابتی به ویژه در افراد مسن افزایش می یابد و سرانجام منجر به نفروپاتی دیابتی می شود [22]. Parham و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر پسته بر روی گلوکز خون بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ را بررسی کردند آن ها ۴۸ بیمار دیابتی را مورد بررسی قرار دادند و برای نیمی از آن ها مغز پسته تجویز شد و دریافتند که پسته اثرات مثبتی بر روی کنتـرل قنـد، فشـار خـون و مارکرهـای التهابی در بیماران دیابتی دارد[23].

هم چنین در سال ۲۰۲۰ یک مطالعه مروری توسط Nowrouzi-Sohrabi و همکاران انجام گردید. آن ها تاثیر پسته را بر روی کنترل قند خون و حساسیت به انسولین در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ مطالعه نمودند و گزارش کردند کـه پسـته بـه طور قابل توجهی باعث کاهش گلوکز خون و بهبود مقاومت بـه انسـولین در بیمـاران دیـس گلیسـمی (Dysglycemia) مـی گردد[24].Sauder و همکاران در سال ۲۰۱۵، تاثیر مصرف پسته بر میزان فاکتورهای التهابی و عملکرد اندوتلیال در مبتلایان به دیابت نوع ۲ را بررسی کردند، در این پژوهش به ۳۰ نفر از افراد بزرگسال در محدوده سنی ۴۰ تا ۷۴ سال مبتلا به دیابت نـوع ۲، به مدت ۲ هفته یک رژیم غذایی حاوی پسته (۲۰ درصد از کالری مصرفی روزانه) تجویز شـد. انـدازه گیـری متابولیـت هـای پلاسمایی این افراد با گذشت دو هفته مشخص کرد، سطح پروتئین واکنشی سی یا CRP در این افراد در مقایسه با گروه کنترل

به میزان قابل توجهی کاهش نشان داد. علاوه بر این مقادیر دو پروتئین مولکول چسبان داخل سلولی[1](ICAM) و مولکول چسبان داخل عروقی[2](VCAM) هر دو کاهش یافت. همچنین میزان هموگلوبینA1c هم در این بیماران کاهش قابل توجهی داشت. بر اساس نتایج در نهایت این گروه نتیجه گرفتند، مصرف پسته در بیماران مبتلا به دیابت می تواند منجر به کاهش فاکتورهای التهابی و کنترل قند خون در این بیماران شود [17]. در پژوهشی دیگر اثرات سودمند مصرف پسته بر سطوح قند، سوخت ساز بدن، التهاب و مقاومت به انسولین بررسی شد. در این مطالعه به مدت ۴ ماه یک رژیم غذایی حاوی۵۷ گرم پسته در روز به ۵۴ نفر تجویز شد. در این افراد آنزیم کراتین کیناز یا CK (مارکر قلبی)، فیبرینوژن، LDL اکسید شده و فاکتور شماره ۴ پلاکتی به طور قابل توجهی کاهش یافت. همچنین اینترلوکین ۶ یا IL-6 نیز کاهش چشمگیری نشان داد. این گروه اینگونه نتیجه گیری نمودند که مصرف پسته می تواند از طریق کاهش سطح LDL اکسید شده و فاکتور شماره ۴ پلاکتی، از تجمع پلاکت ها در رگها، ایجاد آترواسکلروز و انسداد رگها جلوگیری نماید[25].

۳. مواد و روشها

تهیه لیزات مغز پسته

در این تحقیق، رقم پسته اوحدی از شهرستان رفسنجان انتخاب و تهیه شد. PHPK با استفاده از پروتکل هیدرولیز آنزیمی توصیف شده توسط Mohamadi و همکاران (۲۰۱۹) تهیه شد[26].

مطالعات حیوانی

تعداد ۹۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰–۳۰۰ گرم به طور تصادفی به ۱۲ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. این حجم نمونه با توجه به مطالعات مشابه انتخاب گردید[27]. از این ۱۲ گروه، ۲ گروه به عنوان گروه کنترل و یک گروه به عنوان گروه شم و ۹ گروه دیگر به عنوان گروه هدف، در نظر گرفته شدند. قبل از ورود حیوانات به مطالعه، موش ها در گروه های مختلف از نظر وزن بدن همتا سازی شدند. سپس کلیه حیوانات به مدت ۸ هفته در دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و رطوبت بین ۲۵ تا ۳۰ درصد و در چرخه ۱۲ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری گردیدند. موازین اخلاقی کار با حیوانات در طول انجام آزمایشات رعایت شد و کد اخلاق از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان اخذ گردید (IR.RUMS.REC.1398.186). گروه های کنترل به شرح ذیل بودند:

گروه شم (C0): موش های صحرایی دریافت کننده سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی در روز اول و جیره غذایی نرمال

گروه کنترل ۱ (C1): موش های صحرایی دریافت کننده جیره غذایی پرقند و حلال نمکی

کنترل۲ (C2): موش های صحرایی دیابتی شده با STZ دریافت کننده جیره غذایی نرمال و حلال نمکی (گروه کنترل موش های دیابتی)

گروه های هدف نیز به شرح زیر می باشند:

[1] Inter cellular adhesion

[2] Vascular cell adhesion molecule

گروه ۱، ۲ و ۳ (T1, T2 and T3): موش های صحرایی دریافت کننده جیره غذایی نرمال و PHPK با دوزهای به ترتیب ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هر روز

گروه ۴، ۵ و ۶ (T4, T5 and T6): موش های صحرایی دریافت کننده جیره غذایی پرقند و PHPK با دوزهای به ترتیب ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هر روز

گروه۷، ۸ و ۹ (T7, T8 and T9): موش های صحرایی دیابتی شده با STZ دریافت کننده جیره غذایی نرمال و PHPK با دوزهای به ترتیب ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در هر روز

موش ها با استفاده از تزریق STZ با دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت درون صفاقی، دیابتی شدند، پس از سه روز علائم کلاسیک دیابت مانند پرنوشی و پرادرای در آنها ظاهر گردید و روز چهارم قند خون آنها در حالت ناشتا مورد ارزیابی قرار گرفت و قند خون بالاتر از ۳۰۰ mg/dl به عنوان معیار دیابتی شدن در نظر گرفته شد[28]. هم چنین در این مطالعه از یک جیره نیمه سنتزی پر قند (حاوی قند سوکروز۳۰٪) استفاده گردید[29]. دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از PHPK در هر روز به مدت ۸ هفته ، به صورت داخل معده به موش ها خورانده شد.

بررسی مارکرهای بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژی کلیه

پس از پایان ۸ هفته تیمار روزانه با PHPK ، موشهای تحت مطالعه با کتامین بیهوش شدند. نمونه خون از گوشه چشم آنها گرفته و سرم خون آن ها جداسازی شد. میزان کراتینین، اوره، اسید اوریک و آلبومین خون در آزمایشگاه پاتوبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان اندازه گیری شد.

به منظور انجام مطالعات هیستوپاتولوژی بافت کلیه موش های مورد مطالعه بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی جهت رنگ آمیزی هماتوکسلین و ائوزین در فرمالین ۱۰٪ به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. مراحل آبگیری و شفاف سازی به ترتیب با عبور از الکل با درجات صعودی و زایلین انجام شد. سپس بافت ها با پارافین قالب گیری شده و با استفاده از میکروتوم به مقاطع با ضخامت ۴ میکرون برش داده شدند و با روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی شدند و لام ها پس از رنگ آمیزی با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

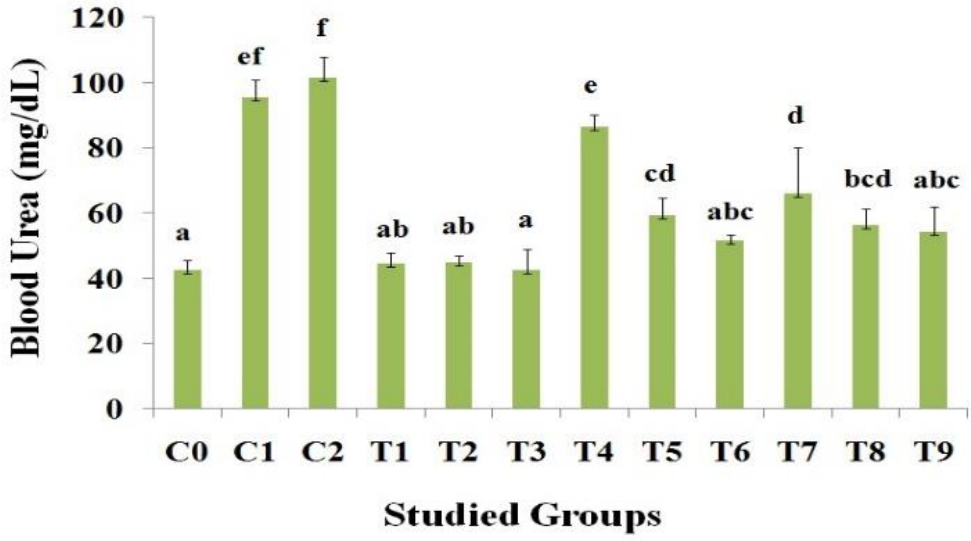
آنالیز داده ها

اطلاعات پس از جمع آوری وارد نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ گردید. بعد از توصیف متغیرهای مختلف جهت انجام تحلیل آماری داده ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. با استفاده از این آزمون میانگین ویژگی های مختلف در گروه های مورد نظر، مورد مقایسه قرار گرفت. در صورت معنی داری از آزمون توکی (Post Hock) برای تعیین اختلاف بین گروه ها استفاده شد. متغیر های وابسته به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (SD) بیان گردیدند و سطح معنی داری در تمام آزمون ها، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۴.نتایج و بحث

نتایج نشان دادکه سطح اوره خون در گروه C1 (کنترل۱) که تنها آب حاوی سوکروز را دریافت نمودند و گروه C2 به طور قابل توجهی از گروه شم (C0) بیشتر است ($P<0.05$). اوره خون در گروه های T1، T2 و T3 که به ترتیب دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ PHPK را دریافت نموده اند، نسبت به گروه شم اختلاف معنی داری نداشتند. سطح اوره خون در گروه های T5 و T6 که

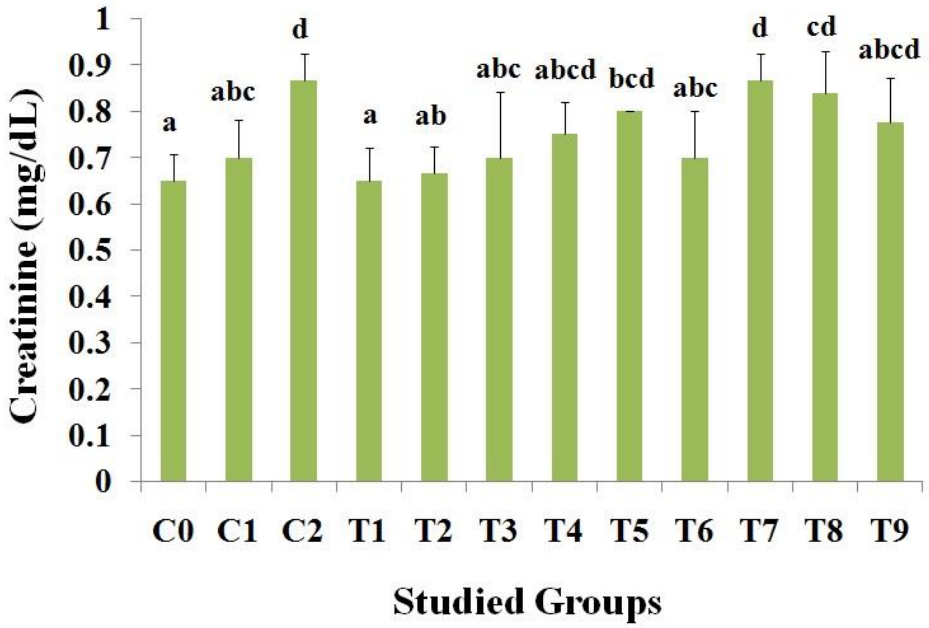
جیره غذایی پر قند داشتند و به ترتیب دوزهای ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم PHPK دریافت نمودند و همچنین در موش های دیابتی که دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم PHPK را دریافت نمودند (به ترتیب گروه های T7، T8 و T9) به طور قابل توجهی کمتر از گروه های C1 (کنترل۱) و C2 (کنترل۲) بودند ($P<0.05$) (شکل۱).



شکل ۱- اثر PHPK بر روی میزان اوره در موش های دیابتی شده و دارای رژیم غذایی پر قند

C0: موش های صحرایی گروه شم که سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. C1: موش های صحرایی دریافت کننده جیره غذایی پر قند. C2: موش های صحرایی کنترل دیابتی شده با STZ. T1-T3: موش های صحرایی دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T4-T6: موش های صحرایی دارای جیره غذایی پر قند و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T7-T9: موش های صحرایی دیابتی شده با STZ و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. تمامی داده به صورت میانگین (Mean ±SD) ارائه شده اند. (*P<0.05)

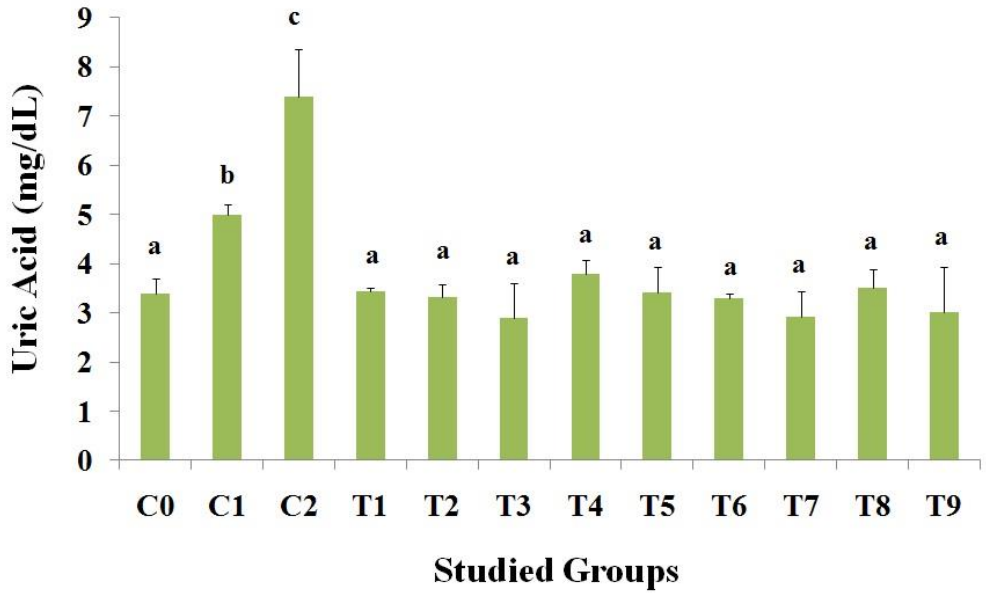
نتایج مطالعه ما نشان داد که تنها در گروه دیابتی C2 سطح کراتینین به طور قابل توجهی بیشتر از گروه شم (C0) بود ($P<0.05$). سطح کراتینین در گروه های T1، T2 و T3 اختلاف معنی داری با گروه کنترل نداشت و همچنین هیچ تفاوت قابل توجهی بین گروه های تیمار شده (T4-T9) و گروه های کنترل C1 و C2 مشاهده نگردید (شکل ۲).



شکل ۲- اثر PHPK بر روی سطح کراتینین خون در موش های صحرایی دیابتی شده و دارای جیره غذایی پر قند

C0: موش های صحرایی گروه شم که سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. C1: موش های صحرایی دریافت کننده جیره غذایی پر قند. C2: موش های صحرایی کنترل دیابتی شده با STZ. T1-T3: موش های صحرایی دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T4-T6: موش های صحرایی دارای جیره غذایی پر قند و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T7-T9: موش های صحرایی دیابتی شده با STZ و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. تمامی داده به صورت میانگین (Mean ±SD) ارائه شده اند. (P<0.05*)

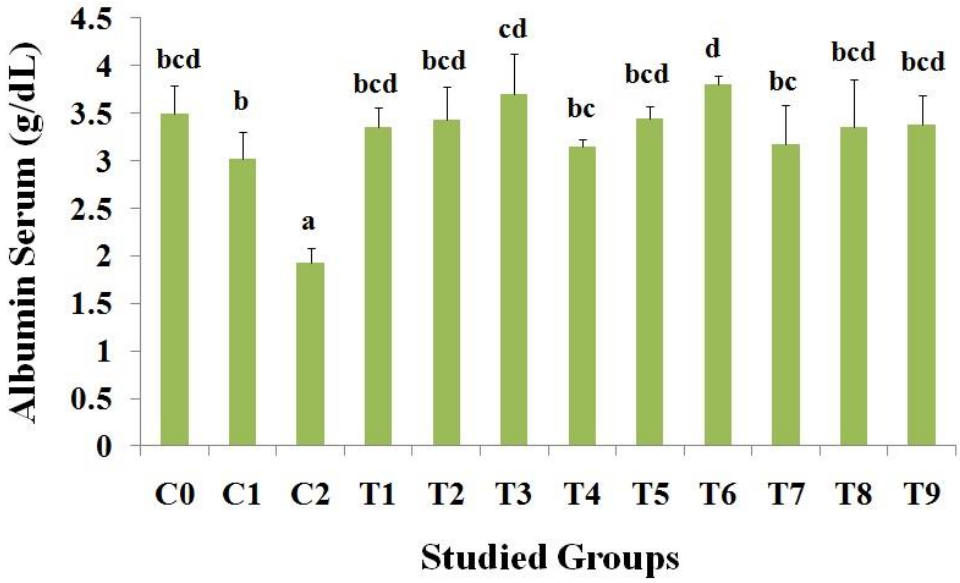
طبق مطالعه انجام شده سطح اسید اوریک در گروه های C1 و C2 به طور معنی داری از گروه شم (C0) بیشتر می باشد (P<0.05). سطح اسید اوریک در گروه های T1، T2 و T3 اختلاف قابل توجهی با گروه شم (C0) نداشت. در موش هایی که جیره غذای پر قند داشتند (گروه های T4-T6) سطح اسید اوریک به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل۱ (C1) کاهش داشت (P<0.05). همچنین در موش های دیابتی شده (گروه های T7-T9) سطح اسید اوریک به طور معنی داری کمتر از گروه C2 بود (P<0.05) (شکل ۳).



شکل ۳- اثر PHPK بر روی سطح اسید اوریک خون در موش های صحرایی دیابتی شده و دارای جیره غذایی پر قند

C0: موش های صحرایی گروه شم که سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. C1: موش های صحرایی دریافت کننده جیره غذایی پر قند. C2: موش های صحرایی کنترل دیابتی شده با STZ. T1-T3: موش های صحرایی دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T4-T6: موش های صحرایی دارای جیره غذایی پر قند و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T7-T9: موش های صحرایی دیابتی شده با STZ و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. تمامی داده به صورت میانگین (Mean ±SD) ارائه شده اند. (*P<0.05)

نتایج نشان داد که تنها در گروه C2، سطح سرم آلبومین به طور قابل توجهی کمتر از گروه شم (C0) بود ($P<0.05$). سطح آلبومین در گروه های T1، T2 و T3 اختلاف معنی داری با گروه شم (C0) نداشت. در گروه T6 که موش ها جیره غذایی پرقند داشتند و میزان ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم PHPK دریافت کردند، سطح آلبومین به طور قابل توجهی از گروه C1 بیشتر بود ($P<0.05$). همچنین در موش های دیابتی شده (گروه های T7، T8 و T9) سطح آلبومین به طور قابل توجهی بیشتر از گروه C2 بود ($P<0.05$) (شکل ۴).



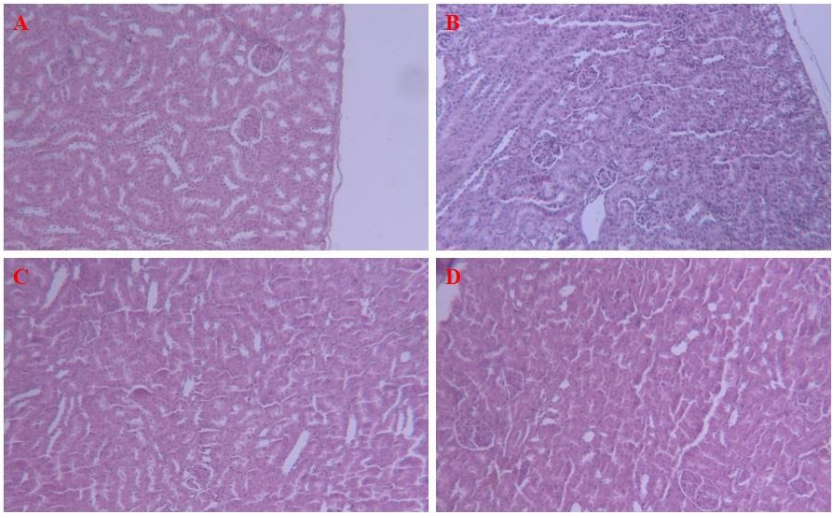
شکل ۴- اثر PHPK بر روی سطح آلبومین خون در موش های صحرایی دیابتی شده و دارای جیره غذایی پر قند

C0: موش های صحرایی گروه شم که سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. C1: موش های صحرایی دریافت کننده جیره غذایی پر قند. C2: موش های صحرایی کنترل دیابتی شده با STZ. T1-T3: موش های صحرایی دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T4-T6: موش های صحرایی دارای جیره غذایی پر قند و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. T7-T9: موش های صحرایی دیابتی شده با STZ و دریافت کننده PHPK با دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم. تمامی داده به صورت میانگین (Mean ±SD) ارائه شده اند. (*P<0.05)

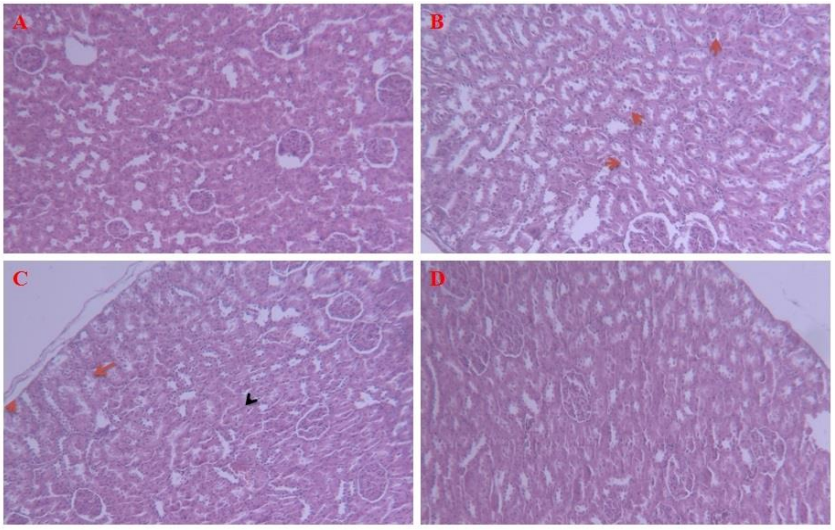
ساختار کلیه در موش های گروه شم (C0) کاملا طبیعی و نرمال بود. در گروه C1 نیز هیچ تغییر پاتولوژیکی مشاهده نگردید و گلومرول ها کاملا طبیعی گزارش شدند. در گروه C2 که موش ها با استفاده از STZ دیابتی شده بودند و جیره غذایی نرمال را دریافت کرده بودند، بررسی هستولوژیک نشان داد که کلیه این موش ها دارای فضای بومن گسترده می باشد و مواد ائوزینوفیلیک در آن تجمع یافته اند و همچنین گلومرول ها شکل غیر طبیعی دارند و مویرگ های گلومرولی متسع شده می باشند. علاوه بر آن پوشش اپیتلیال توبول ها دارای سلول های با هسته پیکنوتیک زیادی می باشد و سیتوپلاسم این سلول ها واکوئله شده است.

در موش های گروه T1 ساختار حفظ شده بود. در گروه T2 در برخی از توبول ها شکل ساختاری حفظ شده و رسوب پروتئین مشاهده شد. در گروه T3 در برخی از توبول ها ساختار حفظ شده، تنگی عروق و رسوب پروتئین مشاهده می شود. تصاویر هستولوژیکی کلیه موش ها در گروه T4 سلول های توبولی دژنره شده و حاشیه مسواکی تخریب شده (البته کمتر از گروه های C2 و T7) با سلول های التهابی مزمن پراکنده در بین مویرگ ها را نشان می دهد. در بافت کلیه موش های گروه T5 ساختار حفظ شده، تنگی عروق، اتساع توبولی، حداقل دژنراسیون سلول های توبولی و تخریب حاشیه مسواکی (کمتر از گروه T4) و رسوب مواد ترشحی ائوزینوفیلیک مشاهده گردید. تصاویر هیستولوژکی بافت کلیه موش های گروه T6 ساختار حفظ شده،

تنگی عروق، اتساع توبولی و رسوب مواد ترشحی ائوزینوفیلیک مشاهده شد. در موش های گروه T7 بررسی های بافت شناسی کلیه نشان داد که عروق خونی کلیه دارای گرفتگی هستند. فضای کپسولی و مویرگ های گلومرولی دچار اتساع خفیف شده اند و شواهدی از رسوب پروتئین داخل توبولی مشاهده می گردد. علاوه بر این سلول های پوشش اپیتلیال دارای سلول های دژنره شده زیاد با هسته های پیکنوتیک و سیتوپلاسم واکوئله (کمتر از گروه C2) می باشد و سلول های تک هسته ای به صورت کانونی، کمی به فضای بینابینی نفوذ کرده اند. بافت کلیه موش های گروه T8 دارای عروق خونی تنگ شده، فضای کپسولی کمی متسع شده می باشند. همچنین کمی از پروتئین ها در فضای داخل توبولی رسوب نمودند و همچنین پوشش اپیتلیال توبولی شواهدی از سلول های دژنره شده با هسته پیکنوتیک را نشان می دهد. در بافت کلیه موش های گروه T9 اتساع توبولی کم، رسوب پروتئین داخل توبولی مشاهده شد. علاوه بر این سلول های پوشاننده اپیتلیال توبولی، سلول های دژنره شده کمی با هسته پیکنوتیک را دارا می باشند (کمتر از گروه های T7 و T8) (شکل های ۵، ۶ و ۷).



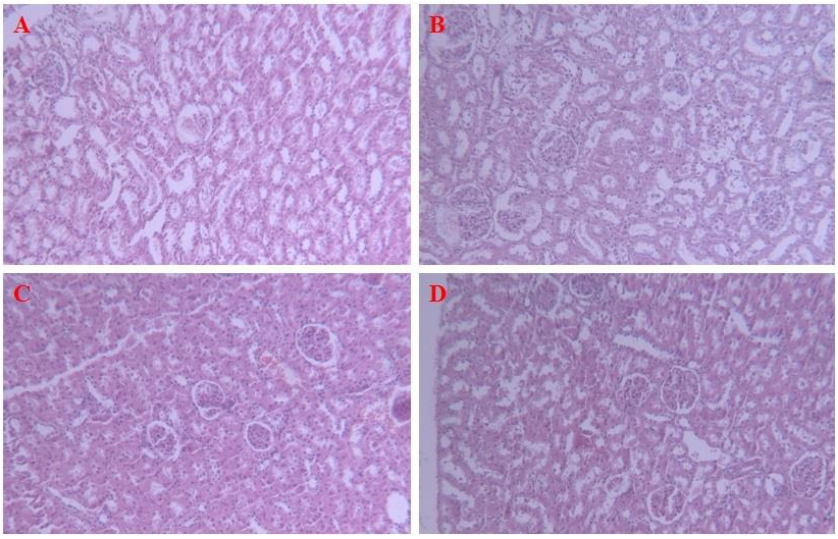
شکل ۵- یافته های بافت شناسی در کلیه در موش های صحرایی نرمال و کنترل دریافت کننده PHPK. (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰×).
C0: موش های صحرایی گروه شم که سرم فیزیولوژی به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. T1، T2 و T3: موش های صحرایی نرمال دریافت کننده PHPKبا دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم.
C0 ساختار طبیعی را نشان می دهد (A). T1 ساختار طبیعی را نشان می دهد (B). T2 ساختار طبیعی و رسوب پروتئین در برخی از لوله ها را نشان می دهد (C). T3 ساختار طبیعی، گرفتگی عروق و رسوب پروتئین در برخی از لوله ها را نشان می دهد (D).



شکل۶- یافته های بافت شناسی در کلیه در موش های صحرایی نرمال و کنترل دریافت کننده PHPK. (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰×).

C1: موش های صحرایی تغذیه شده با جیره غذایی نرمال و دریافت کننده سوکروز ۳۰ درصد در آب نوشیدنی روزانه. T4، T5 و T6: گروه های هدف ۴، ۵ و ۶ که موش های نرمال هستند که سوکروز ۳۰ درصد را در آب نوشیدنی روزانه به همراه PHPKبا دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت می کنند.

C1 هیچ تغییر پاتولوژیکی نشان نمی دهد، گلومرول ها و لوله ها طبیعی است (A). T4 دژنراسیون سلول های توبولار و تخریب حاشیه مسواکی (کمتر از گروه های C2 و T7) (پیکان قرمز) با سلول های التهابی مزمن پراکنده در بین مویرگ ها را نشان می دهد (B). T5 ساختار طبیعی، گرفتگی عروق (پیکان سیاه) اتساع لوله ها، حداقل تخریب سلول های توبولار و تخریب حاشیه مسواکی (کمتر از گروه T4) (پیکان قرمز) و رسوب مواد ترشحی ائوزینوفیلیک رانشان می دهد (C). T6 ساختار طبیعی، گرفتگی عروق، تخریب توبولی و رسوب مواد ترشحی ائوزینوفیلیک را نشان می دهد (D).



شکل ۷-یافته های بافت شناسی در کلیه ها در موش های صحرایی کنترل و دیابتی شده با STZ و تیمار شده با PHPK. (رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۱۰۰×).

C2: موش های دیابتی شده با STZ تغذیه شده با جیره غذایی نرمال و دریافت کننده نرمال سالین. T7، T8 و T9: گروه های هدف ۷، ۸ و ۹ که شامل موش های صحرایی دیابتی شده با STZ و تغذیه شده با جیره غذایی نرمال و PHPKبا دوزهای ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم می باشند.

C2: گلومرول‌های گروه دیابتی، فضای بومن گسترش یافته، رسوب مواد ائوزینوفیلیک به علاوه گلومرول‌های تخریب شده و مویرگ‌های گلومرولی متسع شده را نشان دادند، همچنین پوشش اپیتلیال توبولی سلول‌های بسیاری را با هسته‌های پیکنوتیک و سایر سلول‌ها را با سیتوپلاسم واکوئله نشان می دهد (A). T7 متسع شدن خفیف مویرگ‌های گلومرولی و فضای کپسولی، رسوب پروتئین داخل توبولی را نشان می دهد و همچنین سلول‌های پوششی اپیتلیال توبولی، بسیاری از سلول‌های دژنراتیو را با هسته‌های پیکنوتیک و سایرین با سیتوپلاسم واکوئله (کمتر از گروه C2)، نفوذ خفیف سلول‌های تک هسته‌ای کانونی در بخش بینابینی را نشان می‌دهند (B). T8 رگ‌های خونی تنگ شده، اتساع خفیف فضای کپسولی گلومرولی، رسوب پروتئین داخل برخی از توبول ها را نشان می دهد و همچنین سلول‌های پوششی اپیتلیال لوله‌ای، سلول‌های دژنراتیو را با هسته‌های پیکنوتیک نشان می‌دهند (C). T9 اتساع خفیف توبولی، رسوب پروتئین داخل توبولی را نشان می دهد و همچنین سلول‌های پوششی اپیتلیال توبولی سلول‌های دژنراتیو کمی با هسته‌های پیکنوتیک (کمتر از گروه‌های T7 و T8) را نشان می‌دهند (D).

در این مطالعه هیدرولیزات های پروتئینی مستخرج از مغز پسته (PHPK) با استفاده از یک هیدرولیز آنزیمی ساده و سریع آماده شدند که بر روی موش های دیابتی شده مورد مطالعه قرار گرفتند. در سال های اخیر انواع پپتیدهای مختلف گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته اند و حتی برخی از آنان بازاریابی موفقی به عنوان داروهای بر پایه پپتید به دست آورده اند. این پپتیدهای گیاهی برای سنتز یک پپتید مطلوب در مقایسه با مولکول های کوچک و دیگر داروها بی خطرتر و مطمئن تر می باشند[30].

بخش های مختلف پسته، منابع گران بهایی برای تولید داروهای زیست مولکولی محسوب می گردند زیرا دارای پروتئین ها و پپتیدهای زیست فعال می باشند که برای درمان و مدیریت بیماری های مختلف از جمله سرطان، چاقی و دیابت موثر می باشند[31]. Vildanova و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در مطالعه ای گزارش نمودند که هورمون های گیاهی دارای اثرهای عملکردی مثبتی می باشند که اثر خود را از طریق مسیرهای سیگنالی و مکانیسم های سلولی مختلف اعمال می نمایند[32]. بیشتر پپتیدهای زیست فعالی که برای درمان دیابت استفاده می گردد از طریق تکنولوژی نوترکیب تولید می گردند، که هزینه درمان را افزایش می دهند[33]. مطالعه حاضر مقدمه ای برای تولید یک داروی مقرون به صرفه با استفاده از پپتیدهای حاصل از

هیدرولیزات های پروتئینی مغز پسته است. در این مطالعه از پروتئین هیدرولیزات زیست فعال جدا شده از مغز پسته استفاده گردید که قادر به مهار مکانیسم دیابت می باشد. برخی از مطالعات نشان داده اند که پسته به ترشح انسولین کمک می کنند. زیرا در بیماری دیابت سلول بتای پانکراس دچار تخریب می گردند و در ترشح انسولین اختلال ایجاد می گردد. ویتامین B2 موجود در پسته می تواند حساسیت سلول های کبدی به انسولین را افزایش دهد و ترشح انسولن را القاء کند[24]. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۵، تاثیر مصرف پسته بر میزان فاکتورهای التهابی و عملکرد اندوتلیال در مبتلایان به دیابت نوع ۲ بررسی شد، در این پژوهش بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ به مدت دو هفته رژیم غذایی حاوی پسته را دریافت نمودند و نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مصرف پسته در بیماران مبتلا به دیابت می تواند منجر به کاهش فاکتورهای التهابی و کنترل قند خون در این بیماران شود[17]. هم چنین در پژوهشی دیگر اثرات مصرف پسته بر مقادیر قند خون در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نشان داد، که مصرف پسته می تواند باعث کاهش پروتئین های فاز حاد منفی و کاهش سطح هموگلوبین A1C در بیماران مبتلا به دیابت شود[23].

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاهش در سطح کراتینین می تواند به دلیل بهبود فیلتراسیون گلومرولی و سلول های آسیب دیده با STZ باشد. پپتیدهای جدا شده از پسته و مواد مغذی آن پتانسیل درمانی برای آسیب های کلیه ناشی از STZ را دارند. پروتئین موجود در نخودهای سبز از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی اثرات درمانی بر روی عمکرد کلیه دارند[34]. در مطالعه حاضر همه دوزهای استفاده شده PHPK میزان اوره و کراتینین را به طور قابل توجهی کاهش دادند که می تواند به بهبود عملکرد کلیه مرتبط باشد. پپتیدهای جدا شده از گیاهان همانند دیگر پروتئین های جدا شده از منابع طبیعی به طور خیلی گسترده در درمان بسیاری از اختلالات و بیماری ها مانند دیابت مورد استفاده قرار می گیرد زیرا این پروتئین ها در حیوانات مورد مطالعه قرار گرفته اند و گزارش شده که بسیار کارآمد، مطمئن و بدون عوارض جانبی می باشند[35,36]. هم چنین به دلیل وجود آنتی اکسیدانت ها پسته می تواند باعث کاهش قابل توجهی در سطح گلوکز شود که به صورت وابسته به دوز می تواند اثرات مثبتی بر روی سلامتی و کاهش خطر دیابت داشته باشد[37]. در سال ۲۰۱۷ یک مطالعه بر روی افراد پیش دیابتی انجام گرفت و به بررسی اثر پسته بر متابولیسم ادرار پرداخت. نیمی از شرکت کنندگان رژیم غذایی حاوی پسته و نیم دیگر به عنوان گروه کنترل رژیم غذایی فاقد پسته را به مدت چهار ماه دریافت کردند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که میزان کراتینین به طور قابل توجهی در گروه دریافت کننده پسته افزایش داشته که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت داشت. اما نتایج نشان داد پسته می تواند اختلالات متابولیک مرتبط با مقاومت انسولین و دیابت نوع ۲ را تعدیل و اصلاح کند[38].

افزایش میزان کراتینین نشان می دهد که میزان فیلتراسیون گلومرولی در گروه تیمار شده با STZ کاهش یافته است، اما کاهش میزان اوره و کراتینین بعد از درمان با PHPK می تواند نشان دهنده بهبود عملکرد کلیه باشد. علاوه بر این در روز آخر این مطالعه، میانگین سطح کراتینین در همه گروه های تیمار شده با پسته در مقایسه با سطح کراتینین در گروه تیمار شده با STZ کمتر بود. نتایج این مطالعه می تواند این حقیقت را بیان کند که تزریق STZ باعث آسیب شدید کلیه شده، و تیمار با PHPK بهبود عملکرد کلیه را سبب می گردد. دیابت ملیتوس یک مشکل جهانی است که تعداد زیادی از مردم را تحت تاثیر قرار می دهد. بنابراین بسیاری از داروهای گیاهی در کشورهای مختلف برای درمان این بیماری مورد استفاده قرار می گیرند زیرا درمان های گیاهی می توانند به تنهایی یا همراه با مواد شیمیایی دیگر در کاهش قند خون موثر باشند[22]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که PHPK اثر درمانی رضایت بخشی بر روی دیابت ملیتوس دارد. به طور ویژه درمان با دوزهای بالاتر مسئول عملکرد بهتر کلیه و فعالیت بهتر و درنتیجه کاهش سطوح اوره و کراتینین می باشد. لازم است که انجام تحقیقات تکمیلی در

مورد شناسایی پپتید های موجود در هیدرولیزات پروتئینی مغز پسته انجام شود و بعد از تعیین و شناسایی پپتید های موجود آن، پپتید اثر بخش و سپس توالی اسید امینه این پپتید شناسایی گردد و سپس مکانیسم و اهداف مولکولی پپتیدهای پسته به عنوان یک پپتید گیاهی در درمان دیابت مورد مطالعه قرار گردد تا بتوان از این پپتید گیاهی به عنوان یک داروی موثر در درمان دیابت بعد از تحقیقات بیشتر استفاده نمود.

۵.نتیجه گیری

نتایج حاصل نشان داد که هیدرولیزات ها مستخرج از مغز پسته اثرات درمانی مثبتی بر روی دیابت دارند و درمان با دوزهای بالا می تواند به بهتر شدن عملکرد کلیه و فعالیت بهتر آن برای کاهش سطح کراتین و اوره کمک کند.

۶. پیشنهادات

پپتیدهای موجود در هیدرولیزات های پروتئینی مستخرج از مغز پسته شناسایی و تعیین توالی شود.
مطالعات بیشتر جهت بررسی مکانیسم و هدف های مولکولی پپتیدهای جدا شده از مغز پسته در دیابت انجام گیرد.
مطالعات بالینی و استفاده از پپتیدهای پسته در تولید داروهای ضد دیابت و استفاده از آن در درمان بیماران دیابتی مورد توجه قرار گیرد.

۶. منابع

1. Organization WH., Classification of diabetes mellitus, 2019.
2. Standards of medical care in diabetes-2015 abridged for primary care providers., Clin Diabetes, 33, 2015, pp. 97-111.
3. Chowdhury TA. et al, Diabetes and the kidney, Clin Med (Lond), 21, 2021, pp. e318-e22.
4. Paydar S. et al, The Effect of Hydroalcoholic Extract of Nectaroscordum Tripedale on Liver and Kidney Functional Parameters in Streptozotocin-induced Diabetic Male Rats, Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism, 18, 2016, pp. 112-9.
5. Fioretto P. et al, Histopathology of diabetic nephropathy, Semin Nephrol, 27, 2007, pp. 195-207.
6. Schena FP. et al, Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy, J Am Soc Nephrol, 6, 2005, pp. S30-3.
6. Beeson WL. et al, Comparison of body composition by bioelectrical impedance analysis and dual-energy X-ray absorptiometry in Hispanic diabetics, Int J Body Compos Res, 8, 2010, pp. 45-50.
7. Dai HY. et al, Effects of angiotensin receptor blocker on phenotypic alterations of podocytes in early diabetic nephropathy, Am J Med Sci, 341, 2011, pp. 207-14.
8. Maccabee PJ. et al, Upper leg conduction time distinguishes demyelinating neuropathies. Muscle Nerve, 43 ,2011), pp. 518-30.
9. Selection WHOECot, Use of Essential M, World Health O. WHO model list of essential medicines : 17th list, March 2011. Geneva: World Health Organization; 2011.
10. Deacon CF., A review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors, Hot topics from randomized controlled trials, Diabetes Obes Metab, 20, 2018, pp. 34-46.
11. Yang X. et al, Antimicrobial peptides produced by Brevibacillus spp.: structure, classification and bioactivity: a mini review, World J Microbiol Biotechnol, 34, 2018, pp. 57.
12. Chang CH. et al, Trowaglerix Venom Polypeptides As a Novel Antithrombotic Agent by Targeting Immunoglobulin-Like Domains of Glycoprotein VI in Platelet, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 37, 2017, pp. 1307-14.

13. Ibrahim HR. et al, Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins, Animal Nutrition, 4, 2018, pp. 273-80.
14. Li-Chan ECY., Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients, Current Opinion in Food Science, 1, 2015, pp. 28-37.
15. Shaji J. et al, Protein and Peptide drug delivery: oral approaches, Indian J Pharm Sci, 70, 2008, pp. 269-77.
16. Bibi Y. et al, The Study of Anticancer and Antifungal Activities of Pistacia integerrima Extract in vitro, Indian J Pharm Sci, 74, 2012, pp. 375-9.
17.Sauder KA. et al, Effects of pistachios on the lipid/lipoprotein profile, glycemic control, inflammation, and endothelial function in type 2 diabetes: A randomized trial, Metabolism, 64, 2015, pp. 1521-9.
18. Kay CD. et al, Pistachios increase serum antioxidants and lower serum oxidized-LDL in hypercholesterolemic adults, The Journal of Nutrition, 140, 2010, pp. 1093-8.
19. Sari I. et al, Effect of pistachio diet on lipid parameters, endothelial function, inflammation, and oxidative status: A prospective study, Nutrition, 26, 2010, pp. 399-404.
20. Gebauer. et al, Effects of pistachios on cardiovascular disease risk factors and potential mechanisms of action: A dose-response study, The American Journal of Clinical Nutrition, 88, 2008, pp. 651-9.
21. Molitch ME. et al, Nephropathy in diabetes, Diabetes Care, 27 Suppl, 1, 2004, pp. S79-83.
22. Pyram R. et al, Chronic kidney disease and diabetes, Maturitas, 71, 2012, pp. 94-103.
23. Parham M. et al, Effects of pistachio nut supplementation on blood glucose in patients with type 2 diabetes: a randomized crossover trial, Rev Diabet Stud, 11, 2014, pp. 190-6.
24. Nowrouzi-Sohrabi P. et,al, The effectiveness of pistachio on glycemic control and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes, prediabetes and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis, Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews, 14, 2020, pp. 1589-95.
25. Hernández-Alonso P. et,al, Beneficial effect of pistachio consumption on glucose metabolism, insulin resistance, inflammation, and related metabolic risk markers: a randomized clinical trial, Diabetes Care, 37, 2014, pp. 3098-105.
26. Mohamadi M. et al, Protein hydrolysate derived from Pistachio vera regulates blood glucose level in streptozotocin-diabetic and high-sugar diet-fed rats, PHJ, 2, 2019, pp. 1-16
27. Okoduwa SIR. et al, Appropriate insulin level in selecting fortified diet-fed, streptozotocin-treated rat model of type 2 diabetes for anti-diabetic studies, PLoS One, 12, 2017, pp. e0170971.
28. Gholamhoseinian A. et al, Anti-hyperglycemic activity of four plants extracts effective against alpha glucosidase in normal and diabetic rats, Journal of Kerman University of Medical Sciences, 15, 2009, pp. 35-44.
29. El Hafidi M, et al, Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Δ9 and Δ5-desaturase activities, The Journal of Nutritional Biochemistry, 12, 2001, pp. 396-403.
30. Fosgerau K. et al, Peptide therapeutics: current status and future directions, Drug discovery today, 20, 2015, pp. 122-8.
31. McMacken M. et al, A plant-based diet for the prevention and treatment of type 2 diabetes, Journal of geriatric cardiology: JGC, 14, 2017, pp. 342.
32. Vildanova M. et al, The effect of plant hormones on the components of the secretory pathway in human normal and tumor cells, Cell and Tissue Biology, 8, 2014, pp. 407-15.
33. Hafeez Z. et al, Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products, Food Research International, 63, 2014, pp. 71-80.
34. Hidayat M. et al, Kidney therapeutic potential of peptides derived from the bromelain hydrolysis of green peas protein, Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 22, 2019, pp. 1016-25.
35. Shahramipour F. Effect of pistachio leaf extract on oxidative stress parameters in diabetic rats: university of zabol, 2017.
36. Yanni AE. et al, Functional modulation of gut microbiota in diabetic rats following dietary intervention with pistachio nuts (Pistacia vera L.), Metabol Open, 7, 2020, pp. 100040.
37. Alturfan A. et al, Pistachio Consumption has Beneficial Effects in Diabetic Rat Model. 2009.
38. Hernández-Alonso P. et al, Effect of pistachio consumption on the modulation of urinary gut microbiota-related metabolites in prediabetic subjects, The Journal of Nutritional Biochemistry, 45, 2017, pp. 48-53.