

اثر هیپوگلیسمی عصاره الکلی غلاف لوبیا سبز در موشهای صحرایی نر بالغ سالم و دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین

اکرم عیدی*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مریم عیدی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

حمید ضیاء پور

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

در تحقیق حاضر تاثیر عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز بر میزان قند و انسولین سرم در موشهای صحرایی نر بالغ سالم و دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفت. پس از جمع آوری و شناسایی گیاه، عصاره الکلی توسط دستگاه سوکسله تهیه گردید. حیوانات با استفاده از داروی استرپتوزوتوسین (۷۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) دیابتی گردیدند. عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز با مقادیر ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم وزن بدن بصورت تزریق درون صفاقی به موشهای صحرایی نر سالم و دیابتی شده توسط داروی استرپتوزوتوسین تیمار گردید. نتایج تحقیق نشان داد که تیمار عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز در موشهای دیابتی باعث کاهش میزان قند و افزایش میزان انسولین سرم شده است و در موشهای سالم چنین تاثیری ندارد. مقایسه‌ای بین نقش عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز و داروی متداول ضد دیابتی، گلی بن کلامید (دوز ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) انجام شد. نتایج تحقیق حاضر گویای آن است که خواص کاهش دهنده قند خون عصاره مؤثرتر از داروی گلی بن کلامید می باشد. این گیاه با داشتن اثرات هیپوگلیسمیک و به دلیل عوارض جانبی کمتر در مقایسه با داروهای سنتتیک در درمان دیابت توصیه می گردد، هر چند مکانیسم عمل آن نا مشخص است و احتیاج به تحقیقات بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی بیشتری دارد.

واژه های کلیدی: گیاه لوبیا سبز، هیپوگلیسمی، دیابت، موش صحرایی

مقدمه:

استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری دیابت در طب سنتی قدمتی دیرینه دارد هرچند تجربیات و نتایج علمی اندکی در مجامع علمی ارائه گردیده است^(۱). دیابت بیماری مزمن، مادام العمر و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز است که در بیشتر موارد به علت کاهش ترشح انسولین توسط سلولهای بتا جزایر لانگرهانس ایجاد می‌گردد^(۲). این بیماری با اختلالات متابولیکی، عوارض دراز مدت در چشمها، کلیه‌ها، اعصاب و عروق خونی مشخص شده است و با اختلال وسیع در متابولیسم کربوهیدراتها، چربیها، پروتئینها، آب و الکترولیت‌ها همراه است^(۳). با توجه به ضایعات متعدد و بعضا کشنده‌ای که بیماری در افراد دیابتی به جای می‌گذارد، لزوم بررسی راههای درمان، تخفیف و پیشگیری از آن احساس می‌شود. در حال حاضر با توجه به مشکلات تهیه و تزریق انسولین و سایر داروهای کاهنده قند خون و هم چنین با در نظر گرفتن عوارض جانبی داروهای صناعی توجه محققین به سوی استفاده از داروهای گیاهی جلب گردیده است.

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) گیاهی علفی، یکساله و بالارونده از خانواده بقولات (*Papilionaceae*) است. خوشه‌های گل آن به رنگهای مختلف از کنار برگها ظاهر می‌شوند و میوه آن به شکل نیام است. در سرتاسر دنیا از جمله ایران کشت می‌شود^(۴). در طب سنتی از غلاف بدون دانه گیاه استفاده می‌گردد. غلاف گیاه لوبیا سبز دارای اثرات مختلفی از جمله آنتی‌اکسیدان و هیپولیپیدمیک است^(۵)، اما گزارش علمی اندکی بر اثر ضد دیابتی آن در دسترس می‌باشد.

در پژوهش حاضر، اثر هیپوگلیسمی عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز در موشهای صحرایی نر سالم و دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین مورد بررسی قرار گرفته است و همچنین مقایسه‌ای نیز بین اثر هیپوگلیسمی عصاره الکلی گیاه و داروی متداول گلی‌بن‌کلامید انجام شده است.

مواد و روشها

حیوانات

در این تحقیق از موشهای صحرایی (رات) نر بالغ نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۳۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور ایران استفاده گردید. موشها در اطاق حیوانات با درجه حرارت کنترل شده 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده، آب و غذای کافی همواره در دسترس آنها قرار داشت.

دیابتی نمودن حیوانات

جهت القا دیابت، موشهای صحرایی به صورت درون صفاقی استرپتوزوتوسین (USA. Pharmacia & Upjohn) را با دوز (۷۰ mg/kg) دریافت نمودند. علائم دیابت شامل کاهش وزن، پرنوشی و پرادراری پس از گذشت ۷-۵ روز آشکار گردید. جهت اطمینان بیشتر، میزان قند خون حیوانات از طریق خون گیری از سینوس رترورابتال از گوشه داخلی چشم اندازه‌گیری شد که افزایش قند خون به میزان بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر نشان دهنده دیابتی شدن حیوانات بود.

جمع آوری، شناسایی و تهیه عصاره گیاه

غلاف گیاه لوبیا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) از منطقه ورامین در تابستان ۱۳۸۳ جمع آوری و توسط هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران از نظر تاکسونومیکی مورد شناسایی قرار گرفت. سپس در حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط سایه خشک گردیده و با استفاده از آسیاب مکانیکی به صورت پودر درآمد. پودر خشک تا زمان آزمایش در فریزر یخچال نگهداری گردید. عصاره الکلی با استفاده از دستگاه سوکسله (Soxhlet) و اتانول ۸۰ درصد به دست آمده و توسط دستگاه روتاری (Rotary) خشک گردید.

نحوه تیمار

عصاره گیاهی در دوزهای مختلف، داروی گلی بن کلامید و سرم فیزیولوژیک به صورت تزریق درون صفاقی تیمار گردیدند. حجم ماده تیمار شده در تمامی گروهها ۰/۵ میلی لیتر بود. حیوانات به ۹ گروه تقسیم شدند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر می باشد.

گروه ۱: حیوانات سالم که با سرم فیزیولوژی تیمار شدند.

گروه ۲: حیوانات دیابتی که با سرم فیزیولوژی تیمار شدند.

گروههای ۳، ۴، ۵: حیوانات دیابتی که عصاره گیاهی را با دوزهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

گروه ۶: حیوانات سالم که عصاره گیاهی را با دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

گروه ۷: حیوانات دیابتی که داروی گلی بن کلامید را با دوز ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

نمودند.

روش های بیوشیمیایی

حیوانات با استفاده از اتر بیهوش شده و نمونه های خون از هر حیوان در ساعت صفر (قبل از تیمار عصاره گیاه)، ۱/۵، ۳ و ۵ ساعت بعد از تیمار به روش استون^(۶) از سینوس رترواریتال گوشه داخلی چشم جمع آوری گردید. نمونه های خون بلافاصله سانتریفوژ و سرم آنها جدا گردید و میزان گلوکز سرم به روش گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، ایران) در هریک از آنها اندازه گیری شد. میزان هورمون انسولین به روش رادیوایمونواسی اندازه گیری گردید.

آنالیز آماری داده ها

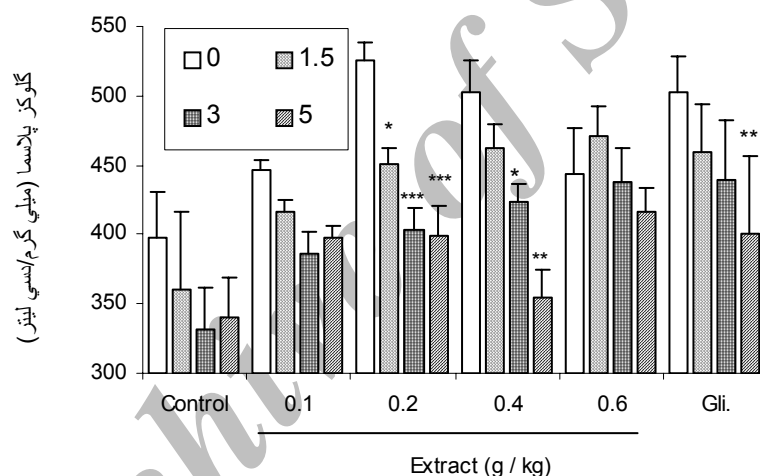
تمامی داده ها از نظر آماری، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و تست Tukey بررسی گردیدند. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{S.E.M.}$ ارائه گردید. معیار استنتاج آماری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

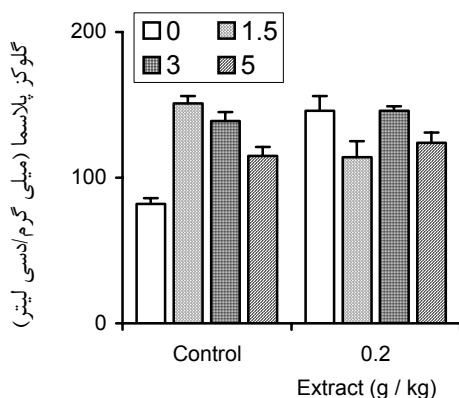
نمودار شماره ۱ نشان می‌دهد که عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز در دوزهای ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن سطح گلوکز سرم را به صورت معنی‌داری در رتهای دیابتی شده کاهش می‌دهد و بیشترین تاثیر عصاره در دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم در ساعت ۳ و ۵ پس از تیمار می‌باشد ($P < 0/001$) که این دوز به عنوان دوز مناسب جهت اندازه‌گیری هورمون انسولین در نظر گرفته شد.

نمودار شماره ۲ نشان می‌دهد که عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز در دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن تاثیر معنی‌داری بر سطح گلوکز سرم در رتهای سالم ایجاد نمی‌کند.

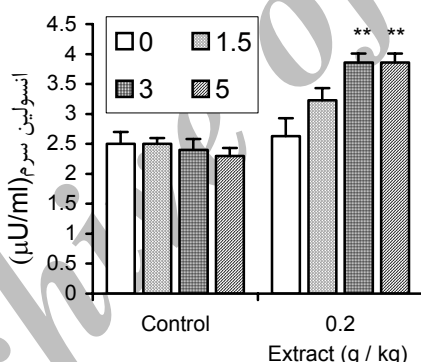
نمودار شماره ۳ نشان می‌دهد که عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز در دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن تاثیر معنی‌داری بر سطح انسولین سرم در رتهای دیابتی شده ایجاد می‌کند ($P < 0/01$).



نمودار شماره ۱- اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی غلاف لوبیا سبز (دوزهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گلی‌بن‌کلامید (دوز ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) بر میزان گلوکز سرم در رتهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین. مقایسه بین زمان صفر (قبل از تیمار) و زمانهای ۱/۵، ۳ و ۵ ساعت پس از تیمار در هر گروه از حیوانات کنترل و دیابتی انجام شده است. حیوانات کنترل سرم فیزیولوژیک و حیوانات تجربی عصاره الکلی غلاف لوبیا سبز یا داروی گلی‌بن‌کلامید را دریافت نمودند. هر ستون $Mean \pm S.E.M$ را نشان می‌دهد. $P < 0/05$ *، $P < 0/01$ **، $P < 0/001$ *** اختلاف میزان گلوکز را در هر زمان با زمان صفر در هر یک از گروهها نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۲- اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی غلاف لوبیا سبز در دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر میزان گلوکز سرم در رتهای سالم. مقایسه بین زمان صفر (قبل از تیمار) و زمانهای ۱/۵، ۳ و ۵ ساعت پس از تیمار در هر گروه از حیوانات کنترل و تجربی انجام شده است. حیوانات کنترل سرم فیزیولوژیک و حیوانات تجربی عصاره الکلی غلاف لوبیا سبز را در دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند. هر ستون $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۳- اثر تزریق درون صفاقی عصاره الکلی غلاف لوبیا سبز در دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر میزان انسولین سرم در رتهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین. مقایسه بین زمان صفر (قبل از تیمار) و زمانهای ۱/۵، ۳ و ۵ ساعت پس از تیمار در هر گروه از حیوانات کنترل و دیابتی انجام شده است. حیوانات کنترل سرم فیزیولوژیک و حیوانات تجربی عصاره الکلی غلاف لوبیا سبز را در دوز ۰/۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند. هر ستون $\text{Mean} \pm \text{S.E.M}$ را نشان می‌دهد. $P < 0.01$ ** اختلاف میزان انسولین را در هر زمان با زمان صفر در هر یک از گروهها نشان می‌دهد.

بحث

دیابت احتمالا سریعترین بیماری متابولیکی در حال رشد در دنیا می‌باشد و مطالعات بر روی این بیماری جهت یافتن روشهای درمانی مناسب‌تر نیز رو به افزایش است^(۷). طب گیاهی در سرتاسر دنیا برای محدوده‌ای از افراد

مبتلا به دیابت کاربرد دارد. مطالعه گیاهان دارویی کلید طبیعی را برای باز کردن مشکلات درمانی این بیماری ارائه می‌نماید.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین با دوز ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن مدل دیابتی را در موشهای صحرایی ایجاد می‌نماید، به طوری که میزان گلوکز به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. استرپتوزوتوسین با وارد نمودن آسیب به غشاء سلولهای بتا پانکراس، قطعه قطعه نمودن DNA و واکنش با آنزیمهایی مانند گلوکوکیناز موجب افزایش میزان گلوکز در حیوانات می‌گردد. استرپتوزوتوسین بیان mRNA مربوط به آنزیم گلوکز-۶-فسفاتاز کبدی را افزایش داده و لذا از این طریق نیز موجب افزایش گلوکز خون می‌شود^(۸). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تیمار کوتاه مدت عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز به صورت معنی‌داری موجب کاهش میزان قند خون و افزایش میزان انسولین پلاسما در موشهای صحرایی دیابتی شده ولی اثر معنی‌داری بر حیوانات سالم اعمال ننموده است.

گزارشاتی مؤید بر نتایج تحقیق حاضر در دسترس می‌باشد که دلالت بر اثر هیپوگلیسمی غلاف گیاه لوبیا سبز دارد^(۹). همچنین اثرات آنتی‌اکسیدانی^(۱۰) و اثرات هیپولیپیدمیک^(۱۱) این گیاه نیز گزارش شده است. Pari و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش نمودند که تیمار خوراکی و دراز مدت عصاره غلاف لوبیا سبز موجب کاهش معنی‌داری در سطح گلوکز خون، هموگلوبین گلیکوزیله و افزایش معنی‌داری در میزان هموگلوبین و انسولین پلاسما می‌شود، همچنین کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیمهای لیپوژنیک و افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیمهای گلوکونوژنیک در کبد موشهای دیابتی دیده می‌شود که در تمامی موارد فوق عصاره لوبیا سبز موثرتر از داروی گلی‌بن‌کلامید عمل می‌نماید. Petlevski و همکارانش در سال ۲۰۰۳ گزارش نمودند که تیمار هفت روزه موشهای دیابتی با عصاره گیاه لوبیا سبز موجب افزایش معنی‌داری در میزان گلوکوتایون S - ترانسفراز در کبد موشهای دیابتی می‌گردد. Savickiene و همکارانش در سال ۲۰۰۳ گزارش نمودند که عصاره غلاف لوبیا سبز می‌تواند از عوارض ناشی از دیابت ملیتوس جلوگیری نماید و نارسایی سیاهرگها و رگهای لنفی را به تاخیر بیندازد و این عمل را با افزایش آنتی‌اکسیدانها و حذف کننده‌های رادیکالهای آزاد انجام می‌دهد. این گیاه احتمالاً دارای اثرات سیستمیکی است که منتهی به تغییراتی در بیان گیرنده انسولین و حاملان گلوکز (GLUT-4) شده و همچنین حساسیت عضلات را به انسولین تغییر می‌دهد^(۱۵). مکانیسم اثر هیپوگلیسمی عصاره غلاف گیاه لوبیا سبز احتمالاً به دلیل تقویت اثر انسولین پلاسما از طریق افزایش ترشح پانکراسی انسولین از سلولهای بتا موجود یا آزادسازی انسولین از فرم اتصالی آن می‌باشد^(۱۶).

بر طبق نتایج تحقیق حاضر عصاره الکلی غلاف گیاه لوبیا سبز موثرتر از داروی متداول ضد دیابتی گلی‌بن‌کلامید در کاهش میزان گلوکز خون موشهای دیابتی شده عمل می‌کند، لذا میتوان عصاره این گیاه را به عنوان داروی ضد دیابتی ایمن‌تری در نظر گرفت. هر چند تحقیق‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی بیشتری را باید جهت استفاده از آن مدنظر قرار داد.

References

- 1- Gray, A. M., and Flatt, P. R., *Proc. Nutr. Soc.*, **56**, 507 (1997).
- 2- *American Diabetes Association*. Clinical practice recommendation. *Diabetes Care* **20** (Suppl. 1), S1 (1997).
- 3- Williams, G., and Pickup, J. C., *Handbook of Diabetes*. 2nd edition, Blackwell Science. Chapter **8**, 48 (2000).
- 4- Moatar, F., and Ardekani, M. R., *Herbal Medicine*, 123 (2000).
- 5- Savickiene, N., Dagilyte, A., Lukosius, A., and Zitkevicius, V, *Medicina (Kaunas)* **38**, 970 (2002).
- 6- Stone, S., *Science* **119**, 100 (1954).
- 7- Baily, C. J., Flatt, P. R., *Indian Biotechnology*, **6**, 139 (1986).
- 8- Merzouk, H., Madani, S., Chabane, D., Prost J., and Bouchenak M., *Belleville. J. Clin. Sci.* **98**, 21 (2000).
- 9- Roman-Ramos, R., Flores-Sanoz, J. L., and Alarcon-Aguilar, F. J. *Journal of Ethnopharmacology* **48**, 25 (1995).
- 10- Venkateswaran, S., and Pari, L., *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **11**, 206 (2002).
- 11- Venkateswaran, S., Pari, L., and Saravanan, G., *Journal of Medicinal Food* **5**, 97 (2002).
- 12- Pari, L., and Venkateswaran, S., *J. Med. Food* **7**, 204 (2004).
- 13- Petlevski, R., Hadzija, M., Slijepcevic, M., Juretic, D., and Petrik, J., *Phytother Res.* **17**, 311 (2003).
- 14- Venkateswaran, S., and Pari, L., *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **36**, 861 (2003).
- 15- Knott, R. M., Grant, G., Bardocz, S., and Pusztai, A., *International Journal of Biochemistry* **24**, 897 (1992).