اثر فلاوونوئید روتین بر میزان گلوکز خون و آنزیم های تنظیم کننده آن در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*)

احمد ایمانی*[۲،۱]، مهرداد فرهنگی[۱]، غلامرضا رفیعی[۱]، راضیه یزدانپرست[۳]،ایزابل وزکز بانانته[۴]

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳. مؤسسه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران
۴. گروه بیوشیمی و زیست شناسی ملکولی، دانشکده داروسازی، دانشگاه بارسلونا

چکیده

امروزه استفاده از پروتئین های گیاهی در جیره غذایی آبزیان و افزایش بهره وری از آن ها از اهمیت خاصی برخوردار است. با این وجود این منابع سرشار از ترکیبات کربوهیدراتی هستند. در این مطالعه اثر تزریق غلظت و انواع مختلف فلاوونوئید روتین در تنظیم میزان قند خون ماهی سیم دریایی در سه آزمایش مختلف مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان با جیره غذایی حاوی ۲۵ درصد نشاسته ژلاتینه شده تغذیه گردیدند. تزریق ۱۰۰ BW mg/kg از هر دو شکل فلاوونوئید روتین (محلول و نامحلول در آب) سبب کاهش معنی دار قند خون (۳۴/۴۴±۲۰۹/۳۹ و ۹/۸۴±۱۲۰/۱۸ mg/dlبه ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین نامحلول در آب، ۶/۵۴±۱۲۵/۵ و ۶/۴۶±۹۹/۸۳ به ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین محلول در آب) و همچنین افزایش معنی دار میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز (۱/۷۷±۰/۲۲ U/g protein و ۱/۲۰±۶/۱۳ به ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین نامحلول در آب، ۱/۵۱±۲۰/۱۹ و ۱/۶۱±۲۵/۷۷ به ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین محلول در آب) گردید. با این وجود، مدت زمان لازم برای اثر گذاری روتین نامحلول در آب، کوتاه تر از نوع محلول در آب آن بود (۶ و ۹ ساعت، به ترتیب). می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که فلاوونوئید روتین توانایی مداخله در متابولیسم گلوکز را در این آبزی دارا می‌باشد. همچنین به نظر می‌رسد که مسیرهای متابولیکی گلوکز حداقل در ماهی سیم دریایی نظیر مدل های دیگر آزمایشگاهی از قابلیت دستکاری، برای تنظیم میزان قند خون، برخوردار است.

واژگان کلیدی: فلاوونوئید روتین، هیپرگلیسیمی، گلوکوکیناز، سیم دریایی

*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: ahmad_im2003@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

۱. مقدمه

صنعت آبزی‌پروری با سرعت بیشتری در مقایسه با سایر بخش‌های تولید منابع غذایی حیوانی در حال رشد است. به علاوه اقبال جهانی بر متراکم‌سازی هر چه بیشتر پرورش آبزیان به دلیل محدودیت منابع آب و زمین در دسترس جهت توسعه این صنعت متکی به جیره غذایی مصنوعی به منظور تأمین مواد مغذی و انرژی مورد نیاز آبزی پرورشی می باشد (Gatlin *et al*., 2007). در این میان، بخش مهمی از نهاده‌های اولیه مصرفی در تولید غذای مورد نیاز مزارع پرورش متراکم آبزیان از منابع دریایی تأمین می‌شود و انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۱۵ سهم آبزی پروری در استفاده از این تولیدات به ۷۰ درصد بالغ گردد. با این وجود علیرغم افزایش تقاضای جهانی برای مصرف پودر ماهی، تولید جهانی این ماده غذایی ثابت باقی مانده است (Panserat, 2009). چنین روندی باعث قوت گرفتن انجام مطالعات بیشتر در زمینه یافتن منابع جایگزین گیاهی و فرمولاسیون بهینه جیره غذایی آبزیان شده است (Panserat *et al*., 2009). پروتئین های گیاهی با آن که به نظر می‌رسد در آینده نقش مهمی در فرمولاسیون‌های غذایی آبزیان ایفا نمایند، اما حاوی مقادیر زیادی ترکیبات کربوهیدراتی هستند. با این وجود استفاده از کربوهیدرات‌ها در ماهیان پرورشی از کارآیی کمتری نسبت به جانوران خشکی‌زی برخوردار است (Hemre *et al*., 2002). این نکته مبین این حقیقت است که مطالعات فیزیولوژی تغذیه آبزیان بایستی در پی شناخت بهتر مسیرهای متابولیسم مواد مغذی (به ویژه گلوکز) در آبزیان و نیز بررسی امکان تنظیم این مسیر از طریق دستکاری تغذیه‌ای آن باشد.تمام آنزیم‌های مورد نیاز برای انجام فرآیند گلیکولیز و متابولیسم گلوکز در ماهیان گزارش شده‌اند (Enes *et al*., 2009).

ماهیان از مکانیسم مشابهی نظیر پستانداران در تنظیم قند خون استفاده می کنند (Polakof *et al*., 2007). بررسی اثر کربوهیدرات ها بر ترشح انسولین در ماهیان نشان داده است که ماهیان نظیر انسان از حالتی شبیه دیابت نوع II رنج می‌برند (Wright *et al*., 2000)، که می‌تواند به دلیل تعداد محدودتر گیرنده‌های انسولین در عضلات ماهیان، ظرفیت محدود فسفریلاسیون گلوکز، تعداد اندک ناقلین گلوکز و سرانجام عدم توانایی ماهیان در تنظیم تعادل میان جذب کبد و تولید گلوکز در کبد باشد (Panserat*et al*., 2001; Polakof*et al*., 2008; Enes*et al*., 2009).

داروهای متعددی جهت اصلاح هومئوستازی گلوکز در انسان استفاده می شوند. این داروها با تحریک ترشح انسولین و بهبود عملکرد آن، تأخیر در گوارش و جذب پلی‌ساکاریدها و یا کاهش تولید گلوکز در کبد عمل می‌کنند (Al- Hasani*et al*., 2003). مکانیسم های احتمالی مقاومت به انسولین در کبد باعث تغییراتی در نسبت فعالیت آنزیم‌های G6Pase/Glucokinase (GK) و افزایش مقدار G6P سلول‌های کبدی می‌گردند (Minassian *et al*., 1998). با ایمپلنت متفورمین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، mRNA آنزیم گلوکوکیناز کبدی افزایش و G6Pase و PFK1 کاهش یافت (Polakof *et al*., 2009). مصرف متفورمین سه روز قبل از نمونه‌برداری در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که قادر به کنترل سطح گلوکز پلاسما است (Panserat *et al*., 2009).امروزه گیاهان منابع مهمی از داروها محسوب می شوند. مکانیسم تأثیر برخی از گیاهان در کنترل متابولیسم گلوکز را می‌توان به فعال یا غیرفعال کردن آنزیم‌های کلیدی گلیکولیز و چرخه کربس نسبت داد (Prabhakar and Doble, 2008). عصاره آبی و پلی‌ساکاریدهای*Liviopespicata* از طریق افزایش فعالیت آنزیم گلوکوکیناز و کاهش فعالیت آنزیم G6Pase موجب بهبود عملکرد انسولین و افزایش ذخیره گلیکوژن در کبد شدند (Bai *et al*., 2009). پلی‌فنول‌ها از طریق ممانعت از گوارش و جذب قندها در روده، تنظیم آزاد شدن گلوکز از کبد و بهبود جذب آن در بافت‌های حساس به انسولین

www.SID.ir

عمل می نمایند (Hanhineva *et al*., 2010). اسید کروزولیک باعث بهبود عملکرد انسولین و جذب گلوکز توسط سلول‌های عضلانی می‌شود (Lee andThuong, 2010). مریم نخودی *Teucriumpolium* از گیاهان متعلق به خانواده Lamiacae در طب سنتی ایرانی کاربرد فراوانی به منظور کاهش قند خون دارد. جزء به جزء سازی عصاره متانولی این گیاه حاکی از وجود چند ترکیب فلاوونوئیدی به نام های Rutin (۰/۳۳٪)، Apigenin (۰/۲۴٪)، 3',6 dimethoxyapigenin (۰/۱۴٪) و 4',6 dimethoxyapigenin (۰/۱۲٪) است (Sharififar *et al*., 2009). خواص ضد دیابتی عصاره متانولی گیاه *T. polium* ناشی از اثر حفاظتی فلاوونوئیدهای آن در برابر استرس اکسیداتیو و سرانجام افزایش ترشح انسولین توسط سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس می باشد (Esmaeili*et al*., 2009). استفاده از ترکیبات ثانویه گیاهی به عنوان افزودنی‌های غذایی در صنعت آبزی پروری به تازگی مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیبات از مشتقات گیاهی به شمار می روند که به منظور افزایش خوشخوراکی و یا کارآیی رشد و تغذیه‌ای آبزی به جیره غذایی اضافه می شوند. ترکیبات گیاهی مذکور (مانند ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی) اثرات متعددی در موجود هدف نظیر بهبود کارآیی تغذیه‌ای و گوارش و کاهش ترشح نیتروژن بر جای می گذارند (Encarnação, 2008). در این میان فلاوونوئیدها طیف گسترده ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی را شامل می‌شوند که از اهمیت بسزایی در علوم دارویی به عنوان مواد آنتی اکسیدانی، ترکیبات بازدارنده رشد تومورهای سرطانی و ... برخوردار می باشند (Hanhinova *et al*., 2010). با توجه به اهمیت کربوهیدرات‌ها به عنوان منابع ارزان قیمت تأمین انرژی و همچنین فراوانی حضور آن‌ها در منابع غذایی گیاهی، شناسایی مسیرهای احتمالی متابولیسم گلوکز که از قابلیت دستکاری به منظور ارتقاء توانایی آبزیان بویژه ماهیان پرورشی گوشتخوار برخوردار باشند، ممکن است در تهیه جیره‌های غذایی با کیفیت، مؤثر واقع گردد. تهیه جیره‌های غذایی با کیفیت مناسب که از یک سو موجب افزایش رشد و بهبود کارآیی حیوان گردد و از سوی دیگر موجب به حداقل رسیدن تلفات مواد مغذی شود، از اهمیت زیادی در توسعه پایدار پرورش آبزیان برخوردار است (Oliva-Teles, 2000). در این مطالعه اثر استفاده از فلاوونوئید روتین بر میزان قند خون و مسیر متابولیسمی گلوکز و همچنین غلظت مؤثر این ترکیب جهت فراهم آوردن اطلاعات پایه برای دستکاری مسیرهای متابولیسمی گلوکز در کبد و افزایش قابلیت این گونه و سایر آبزیان گوشتخوار در استفاده از منابع غذایی حاوی کربوهیدرات‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش ها

سیستم پرورشی و شرایط نگهداری بچه ماهیان جوان سیم دریایی (*Sparus aurata*) از مزرعه پرورش تجاری این ماهی در کشوراسپانیا تهیه و به دانشگاه بارسلونا منتقل گردیدند. ۳۰ قطعه ماهی در هر مخزن ۲۵۰ لیتری با جریان مداوم آب به صورت یک سازگان بسته پرورش آبزیان در اتاق عایق حرارتی، توزیع شدند. پیراسنجه‌های کیفی آب به طور مرتب هر هفته سنجیده شد (جدول ۱). میزان تعویض آب حدود ۳۰ درصد در هفته بود. ماهیان گروه های مختلف آزمایشی دو مرتبه در روز و در حد ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند. این مطالعه به مدت ۳ هفته و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. آزمایشات دو هفته بعد از تطبیق پذیری ماهیان به سیستم پرورشی آغاز گردیدند.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱.فاکتورهای کیفی آب در دوره پرورش ماهیان

پیراسنجه	درجه حرارت	اکسیژن	شوری	آمونیاک	pH
مقدار	۱۸±۰/٤°C	۷±۰/۲ ppm	۳۸±۰/۵ ppt	۰/۰۲±۰/۰۱ ppm	۷/۸±۰/٤

جیره غذایی مورد استفاده به ترتیب دارای ۲۵، ۴۴/۶ و ۱۴/۵ درصد کربوهیدرات، پروتئین و چربی بود. سطح کربوهیدرات در جیره‌های غذایی بالاتر از حد بهینه (۱۵ درصد) برای رشد مطلوب ماهی سیم دریایی تنظیم شد (Koven, 2002).

در این مطالعه سطح مؤثر فلاوونوئید روتین و همچنین مدت زمان لازم برای اثرگذاری آن طی سه آزمایش تعیین گردید. از آنجائیکه سنجش آنزیم های متابولیکی گلوکز در کبد از هزینه زیادی برخوردار است، به خاطر حصول اطمینان از این که با تزریق روتین میزان آنزیم گلوکوکیناز در کبد افزایش می یابد (نتایج آزمایش اول)، در آزمایش دوم آنزیم های کبدی سنجیده نشدند.

آزمایش اول

وزن ماهیان مورد استفاده در این آزمایش۲/۱۰±۳۲/۵۳ گرم بود. در پایان هفته دوم تغذیه با جیره غذایی آزمایشی، در روز آزمایش ماهیان یک ساعت بعد از تغذیه با غلظت ۷۰ mg/l از MS-222 بیهوش و روتین نامحلول در آب در غلظت های۰ (CD)، ۵۰ (R50D)، ۱۰۰ (R100D) و ۵۰۰ mg/kg BW (R500D) به صورت درون صفاقی تزریق شد (Hanhinova *et al*., 2010). روتین در محلول نمکی Tween یک درصد امولسیون گردید (Torres-Piedra *et al*., 2010). نمونه های خون و کبد به ترتیب ۰، ۳ و ۶ ساعت بعد از تزریق تهیه شد(حداقل ۷ ماهی از هر تیمار) (Peres *et al*., 1999). نمونه های خون بلافاصله در ۴ درجه سانتیگراد و g ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. تمام نمونه های پلاسمای حاصل تا زمان انجام سنجش ها در ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Figueiredo-Silva *et al*., 2010).

آزمایش دوم

وزن ماهیان مورد استفاده در این آزمایش۱/۴۴±۲۶/۰۵ گرم بود. در پایان هفته دوم تغذیه با جیره غذایی آزمایشی، در روز آزمایش ماهیان یک ساعت بعد از تغذیه با استفاده از MS-222 بیهوش و روتین محلول در آب بر اساس نتایج حاصل از آزمایش اول در غلظت‌های ۰ (CD)، ۵۰ (R50D)، ۱۰۰ (R100D) و ۲۰۰ mg/kg BW (R200D) به صورت درون صفاقی تزریق گردید. بدین منظور روتین در سرم فیزیولوژیکی حل شد. نمونه های خون و کبد به ترتیب ۰، ۶ و ۹ ساعت بعد از تزریق تهیه گردید (حداقل ۷ ماهی از هر تیمار). بقیه مراحل نظیر آزمایش اول صورت پذیرفت.

آزمایش سوم

وزن ماهیان مورد استفاده در این آزمایش۱/۹۰ ±۱۴/۰۲ گرم بود. در پایان هفته دوم تغذیه با جیره غذایی آزمایشی، در روز آزمایش ماهیان یک ساعت بعد از تغذیه با استفاده از MS-222 بیهوش و روتین محلول در آب با توجه به نتایج آزمایش های اول و دوم در غلظت های ۰ (CD) و ۱۰۰ mg/kg BW (R100D) به صورت درون صفاقی تزریق گردید. روتین در سرم فیزیولوژیکی حل شد. نمونه های خون و کبد به ترتیب ۰، ۳، ۶، ۹ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق از تیمارهای مختلف (حداقل ۷ ماهی از هر تیمار) تهیه گردید. بقیه مراحل نظیر آزمایش اول صورت پذیرفت. میزان گلوکز نمونه های خون با استفاده از کیت تجاری (Spain ,Spinreact) تعیین شد.

عصاره خام مورد نیاز جهت انجام سنجش های آنزیمی از طریق همگن نمودن کبد منجمد پودر شده (۱:۵ w:v) در محلول ۵۰ میلی مولار Tris-Hcl با pH=۷/۵، ۴ میلی مولار EDTA، ۵۰ میلی مولار

Archive of SID
www.SID.ir

NaF، ۱۰۰ میلی مولار KCl، ۰/۵ میلی مولار PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride)، ۱ میلی مولار DTT (Dithiothreitol) و ۲۵۰ میلی مولار سوکروز (Sucrose) و سانتریفوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای۴ درجه سانتیگراد و g ۲۰۰۰۰ تهیه شد (Metonet al., 1999). مقدار پروتئین محلول عصاره ها به روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976).

فعالیت آنزیم گلوکوکیناز به کمک تغییرات در میزان جذب نوری در nm ۳۴۰ در دمای۳۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از آنزیم Glucose-6-(G6PDase) phosphate dehydrogenase به عنوان آنزیم کمکی در حضور NADP تعیین گردید(Caseras et al., 2000).

سنجش فعالیت آنزیم PFK1 از طریق ثبت تغییرات در میزان جذب نوری در طول موج nm ۳۴۰ در دمای۳۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از آنزیم‌های کمکی Fructose bisphpsphatealdolase، Triose-phpsphateisomerase و Glycerol-3-phosphate dehydrogenase در حضور NADP انجام شد (Meton et al., 2003). میزان فعالیت FBPase1 در حضور آنزیم‌های کمکی Phosphate-glucose isomerase و G6P-DH و در طول موج ۳۴۰nm نظیر دیگر آنزیم‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد تعیین گردید (Meton et al., 1999).

میزان فعالیت آنزیم PK به کمک تغییرات در میزان جذب نوری در nm ۳۴۰ در دمای۳۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از آنزیم کمکیLactate dehydrogenase در حضور NADP تعیین گردید (Meton et al., 2003).

از آزمون‌های Kolmogorov Smirnove به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه برای مقایسه واریانس تیمارها و از آزمون توکی برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین ها استفاده گردید. در مواقع لازم از آزمونt-استیودنت نیز استفاده به عمل آمد. در آزمون های آماری سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی دار بین تیمارها در نرم‌افزار SPSS 15 تلقی شد. نتایج به صورت Mean±SE گزارش شدند.

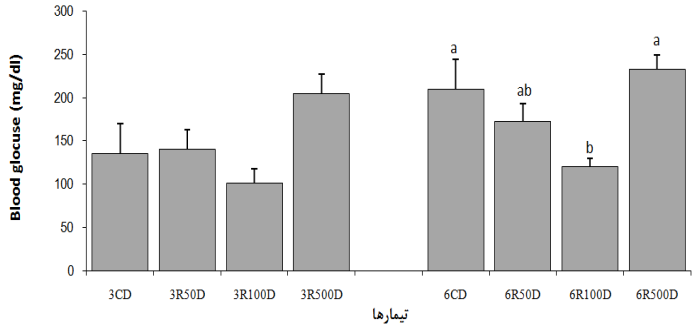
۳. نتایج

آزمایش اول

همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود، ۳ ساعت بعد از تزریق روتین، هیچ اختلاف معنی داری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده نشد. اما با گذشت ۶ ساعت از تزریق این ترکیب، اختلاف معنی داری از نظر میزان گلوکز خون میان 6CD، 6R100D و 6R500D مشاهده گردید، به نحوی که دریافت mg/kg ۱۰۰ BW روتین سبب کاهش معنی دار مقدار گلوکز خون گردید (P<۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات ها (گلوکز) در جدول ۲ ارائه شده است. در میان آنزیم های مورد مطالعه تنها میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز (GK) ۶ ساعت بعد از تزریق روتین، با سایر تیمارها اختلاف معنی دار نشان داد (P<۰/۰۵).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. میزان قند خود در زمان های مختلف نمونه برداری بعد از تزریق غلظت های مختلف روتین نامحلول در آب. حروف مختلف روی ستون ها نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد (P<۰/۰۵).

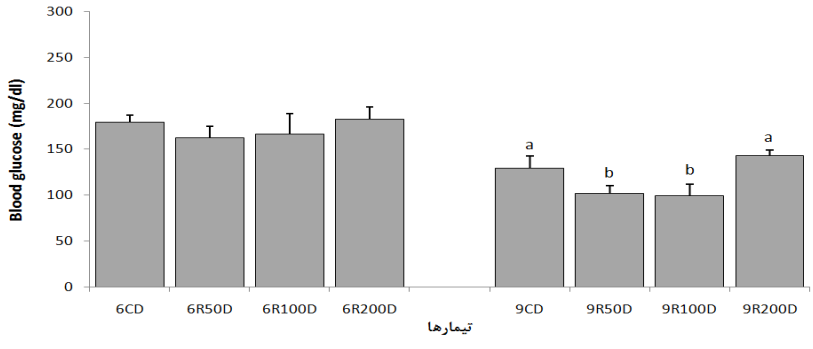
جدول ۲.میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌هاپس از تزریق غلظت‌های مختلف روتین بر حسب U/g protein (Mean±SE)

آنزیم / ساعت	3CD	3R50D	3R100D	3R500D	6CD	6R50D	6R100D	6R500D
GK	۰/۵۰±۰/۳۰	۰/۷۲±۰/۳۸	۰/۳۴±۰/۱۱	۰/۵۸±۰/۲۸	۱/۷۷±۰/۲۲[b*]	۳/۸۱±۰/۶۰[ab]	۶/۱۳±۱/۲۰[a]	۳/۰۲±۰/۲۵[b]
PFK1	۳۳/۵۵±۰/۴۰	۳۱/۹۳±۱/۲۹	۲۹/۱۷±۰/۸۰	۳۲/۸۹±۰/۷۱	۳۲/۲۳±۰/۴۰	۳۰/۶۷±۱/۱۴	۳۱/۰۰±۰/۸۲	۳۰/۴۴±۰/۷۹
FBPase1	۷۹/۸۱±۵/۸۶	۷۶/۵۷±۱۰/۹۴	۶۲/۷۵±۱/۸۳	۷۷/۲۱±۷/۱۳	۶۱/۱۴±۲/۷۶	۵۹/۳۸±۳/۲۸	۵۴/۷۳±۱/۴۸	۶۱/۹۴±۳/۸۷
PK	۲۹۱/۹±۱۷/۶۶	۲۸۲/۳±۱۰/۴۹	۲۸۸/۸±۱۱/۰۹	۳۲۰/۰±۱۶/۹۷	۳۱۱/۵±۱۵/۳۳	۳۲۴/۴±۱۱/۰۸	۳۱۶/۴±۱۰/۶۴	۳۱۴/۴±۱۸/۹۸

* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد(P <۰/۰۵).

آزمایش دوم

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، ۶ ساعت بعد از تزریق روتین محلول در آب، اختلاف معنی دار آماری از نظر میزان گلوکز خون میان تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده نشد. اما با گذشت ۹ ساعت از تزریق این ترکیب، اختلاف معنی داری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای آزمایشی مشاهده گردید، به نحوی که دریافت BW ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg روتین سبب کاهش معنی دار مقدار گلوکز خون در مقایسه با سایر تیمارها گردید (P<۰/۰۵).

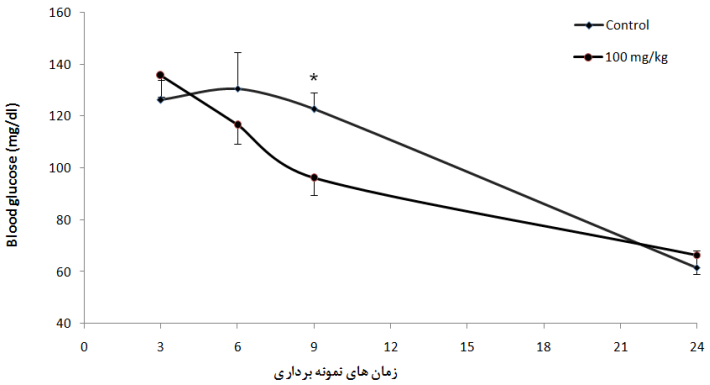


Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۲. میزان قند خود در زمان‌های مختلف نمونه برداری بعد از تزریق غلظت‌های مختلف روتین محلول در آب. حروف مختلف روی ستون‌ها نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد (P<۰/۰۵).

آزمایش سوم

همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، ۳ و ۶ ساعت بعد از تزریق روتین، اختلاف معنی دار آماری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد. اما با گذشت ۹ ساعت از تزریق این ترکیب، اختلاف معنی داری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای مختلف مشاهده گردید، به نحوی که دریافت ۱۰۰ mg/kg BW روتین سبب کاهش معنی دار مقدار گلوکز خون در مقایسه با تیمار شاهد گردید. با این حال در ساعات بعدی نمونه برداری اختلافی از این نظر بین تیمارها مشاهده نشد. میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها (بجز GK) در جدول ۳ ارائه شده است. در میان آنزیم‌های مورد مطالعه تنها میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز (GK) ۹ساعت بعد از تزریق روتین (شکل ۴)، اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵).

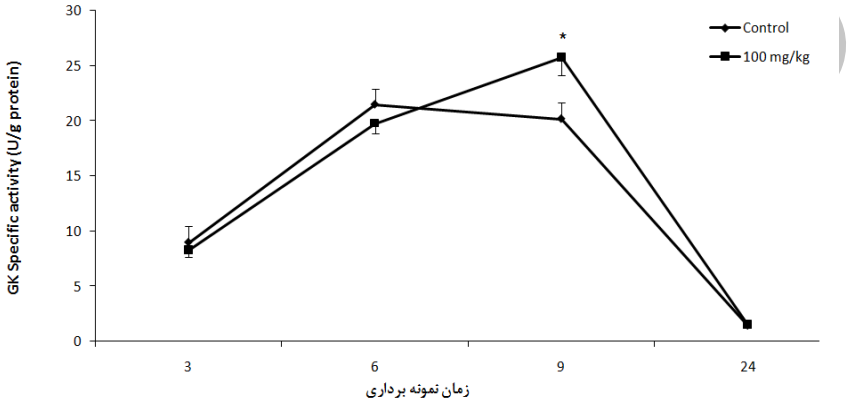


شکل ۳. میزان قند خون در زمان های مختلف نمونه برداری بعد از تزریق ۱۰۰ mg/kg BW روتین محلول در آب. . علامت * روی نمودار نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد (P<۰/۰۵).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳. میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها پس از تزریق غلظت‌های مختلف روتین به U/g protein (Mean±SE)

آنزیم / ساعت	9CD	9R100D	24CD	24R100D
PFK1	۳۶/٤۸±۱/۲٦	۳۹/٦۱±۳/۰٥	۳۷/۱۹±۱/٤٦	۳۹/٤٦±٤/۳۸
FBPase1	۷۱/۸۳±۲/۳۹	٦۹/۰٥±٤/۸٥	۷۹/۱۸±٥/۷٦	۷۲/۱٤±۱/٥٦
PK	۳۷۳/۱±۱۹/۰۸	۳۷٤/۳±۱٤/۹٦	۳٤۲/٤±۱۷/۹۹	۲۹۸/۸±۲۹/٦۹



شکل ۴. میزان فعالیت آنزیم GK بعد از تزریق mg/kg ۱۰۰ BW روتین محلول در آب. علامت * روی نمودار نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد (P<۰/۰٥).

۴. بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش اول، می‌توان نتیجه گرفت که دوز mg/kg۱۰۰ BW از کارآیی بیشتری در مقایسه با سایر سطوح مورد استفاده در این مطالعه در کاهش میزان گلوکز خون برخوردار است. این نتایج با سایر مطالعات موجود در این زمینه در موش‌های دیابتی شده منطبق می‌باشد؛ طی آزمایشی در موش‌های دیابتی، تجویز روزانه روتین به مدت ۴۵ روز سبب کاهش معنی دار میزان گلوکز خون گردید و در میان دوزهای مورد استفاده (۲٥، ٥۰ و ۱۰۰ mg/kg BW) دوز بالاتر از اثر بخشی بیشتری برخوردار بود (Kamalakkannan and Prince, 2006; Kamalakkannan and Alnumair, 2009). در مطالعه دیگری روی موش‌های دیابتی تزریق ٥۰ mg/kg BW روتین سبب کاهش میزان گلوکز خون گردید (Henrique-Fernandez *et al.*, 2010). تجویز عصاره آبی گل بابونه (۵۰۰ mg/kg BW/day)esculetin، (٥۰ mg/kg BW/day) و quercetin (٥۰ mg/kg BW/day) به موش‌های دیابتی (مدت ۲۱ روز) باعث کاهش قند خون در مقایسه با موش‌های دیابتی بدون تیمار شد (Kato *et al.*, 2008). در موش‌های دیابتی دوز ٥۰ mg/kg BW از apigenin-6-C-β-l-fucopyranoside موجب کاهش میزان گلوکز خون در مقایسه با گروه بدون درمان گردید (Cazarloi *et al.*, 2009).

Archive
www.SID.ir

نتایج مربوط به میزان گلوکز خون در آزمایش های دوم و سوم با استفاده از روتین محلول در آب نشان داد که غلظت ۱۰۰ mg/kg BW از کارآیی بیشتری در مقابسه با سایر سطوح مورد استفاده برخوردار است. با این تفاوت که کاهش معنی دار مقدار قند خون برای شکل محلول در چربی در ۶ ساعت و برای نوع محلول در آب ۹ ساعت بعد از تزریق بود. تأثیر سریع روتین نامحلول در آب ممکن است به دلیل جذب سریع آن از پرده صفاق و هپاتوسیت‌ها و در نتیجه مداخله سریعتر آن در مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی باشد که در بخش فعالیت‌های آنزیمی به آن اشاره خواهد شد. متیلاسیون فلاوونوئیدها باعث بهبود جذب آن‌ها از غشاهای زیستی و افزایش زیست فرآهمی آن‌ها می‌شود (Walle, 2009). جذب اشکال چربی دوست quercetin و اشکال بدون قند آن سریع‌تر از مشتقات آبدوست با گروه‌های آسیل و سولفات می‌باشد (Spencer *et al*., 2004; Materska, 2008). خاطر نشان می‌شود که شکل آبدوست فلاوونوئید مورد استفاده در آزمایش دوم و سوم به صورت نمک سولفاتی بود (Merck fact sheet, Germany).

نتایج سنجش فعالیت‌های آنزیمی نشان داد که تزریق هر دو شکل فلاوونوئید روتین با دوز مؤثر ۱۰۰ BW mg/kg سبب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم گلوکوکیناز کبد شد. افزایش فعالیت GK مشابه روند کاهش میزان گلیسیمی خون ماهیان مورد مطالعه بود، به نحوی که در آزمایش اول با استفاده از روتین محلول در چربی بیشینه فعالیت آنزیمی ۶ ساعت بعد از تزریق تعیین شد. میزان بیشینه فعالیت GK در آزمایش سوم ۹ ساعت بعد از تزریق ثبت گردید. کوچکترین تغییر در میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز سبب تغییر سرعت فسفریلاسیون گلوکز در درون سلول‌های بتا و کبدی می شود (Postic *et al*., 2001). اثر تغییر در میزان فعالیت گلوکینازی کبد در هموستازی گلوکز کل (بدن)، در موش‌های با یک نسخه اضافی از ژن این آنزیم بررسی شده است. این افراد همچنین در مقایسه با موش‌های معمولی دارای ۵۰ درصد افزایش در فعالیت آنزیمی بودند و سطح گلوکز پلاسمای آنها ۲۵ درصد کاهش نشان داد. حذف ژن آنزیم گلوکوکیناز به صورت موضعی و تنها در کبد، سبب بروزحالتی شبیه مقاومت انسولینی در موش‌ها شد (Iynedjian, 2009). از مهمترین داروهای مورد استفاده برای اصلاح هموستازی گلوکز می‌توان به متفورمین اشاره کرد که از طریق بهبود پاسخ کبد به انسولین اثر خود را در کاهش قند خون بروز می‌دهد. در مطالعه انجام شده روی موش‌های دیابتی، نسبت فعالیت آنزیمی G6Pase/GK دو برابر افزایش یافت. با این که خوراندن متفورمین اثری در کاهش این نسبت نداشت، اما سبب بازگرداندن اثر انسولین در کاهش غلظت G6P سلول‌های کبدی شد (Minassian *et al*., 1998). ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با ایمپلنت متفورمین از میزان گلوکز خون بالایی بعد از تزریق گلوکز برخوردار بودند. در کبد این گروه از ماهیان mRNA آنزیم گلوکوکیناز افزایش و G6Pase و PFK1 کاهش یافت. محققین عدم اثر متفورمین بر میزان قند خون را در مقایسه با ایمپلنت انسولین، به گرسنگی شش روزه ماهیان نسبت دادند. زیرا در این شرایط تمامی مکانیسم‌های درونی جهت جلوگیری از افت قند خون آغاز می شود (Polakof*et al*., 2009). بررسی دیگری در ارتباط با گنجانیدن متفورمین سه روز قبل از نمونه‌برداری برای تعیین قند خون در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که متفورمین قادر به کنترل سطح گلوکز پلاسما می باشد. همچنین میزان بالای کربوهیدرات در جیره موجب افزایش بیان ژن آنزیم‌های گلوکوکیناز و آنزیم‌های لیپوژنیک glucose-6P dehydrogenase, (G6PDH) Fatty acid synthase گردید. البته وجود متفورمین در جیره غذایی موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن آنزیم G6PDH گردید (Panserat *et al*., 2009). با گنجانیدن ۰/۲ g/kg diet از فلاوونوئید naringin یا hesperidin در جیره غذایی موش های با دیابت نوع

Archive of SID
www.SID.ir

II (به مدت ۵ هفته) مشاهده شد که فلاوونوئیدها سبب افزایش میزان بیان ژن رمز کننده GK در کبد این موش‌ها شد (Jung *et al*., 2004). به نظر می رسد فلاوونوئیدها دارای مکانیسم عملکردی دوگانه تنظیم کننده ترشح انسولین و شبه انسولینی می باشند (Cazarolli *et al*., 2009).

تزریق اشکال مختلف فلاوونوئید روتین در این مطالعه برای اولین بار نشان داد که مشابه مدل‌های پستانداران، قادر به کاهش میزان گلوکز خون از طریق فعالسازی مسیر فسفریلاسیون آن در کبد هستند. از سوی دیگر این یافته نشان می دهد که مسیرهای پیامرسانی و متابولیسم گلوکز دست کم در ماهی سیم دریایی مشابه پستانداران می باشد. این تشابه می تواند نوید بخش استفاده از روش های اصلاح مسیرهای متابولیسمی مورد استفاده در انسان برای افزایش کارآیی آبزیان گوشتخوار در استفاده از منابع غذایی حاوی مقادیر بالای کربوهیدرات از یک سو و استفاده از آبزیان به عنوان مدل های آزمایشگاهی جهت انجام مطالعه در مورد دیابت از سوی دیگر باشد. با این حال، برای شناخت بهتر مکانسیم عملکرد فلاوونوئیدها در آبزیان، نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه زیست فرآهمی، مکانیسم جذب سلولی، متابولسیم و فعالیت زیستی متابولیت های حاصل و غلظت های مؤثر اضافه شونده به جیره غذایی و مقایسه اثرات حاصل با نتایج به دست آمده از تزریق این ترکیبات است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت های مالی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری جمهوری اسلامی ایران به خاطر فرآهم آوردن شرایط اقامت در کشور اسپانیا و همچنین حمایت‌های مالی دانشگاه بارسلونا جهت انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

Al-hasani, H., Tschop, M.H., Cushman, S.W. 2003. Two Birds with One Stone. Mol. Interv. 3: 367-374.

Bai, X., Chen, X., Liu, Y., Tian, L., Zhou, Q., Liu, S., Fang, J., Chen, J. 2009. Effects of water extract and crude polysaccharides from *Liriopespicata*var. *prolifera* on InsR/IRS-1/PI3K pathway and glucose metabolism in mice. J. Ethnopharmacol. 125: 482-486.

Bhagavan, N.V. 2002. Carbohydrate metabolismo II: Gluconeogenesis, glycogen synthesis and breakdown and alternative pathways. In: Medical biochemistry, Fourth Edition. Harcourt/Academic Press, Massachusetts, USA, pp 275-305.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.Anal.Biochem. 72: 248-254.

Caseras, A., Meton, I., Fernandez, F., Baanante, I.V. 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in the liver of gilthead seabream (*Sparusaurata*). Biochim. Biophys. Acta 1493: 135–141.

Cazarolli, L.H., Folador, P., Moresco, H.H., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R. M.B. 2009. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C- (2”-O-α-L-rhamnopyranosyl)-β-l-fucopyranoside on ^{14}C-glucose uptake. Chem. Biol. Interact. 179: 407-412.

Encarnação, P. 2008. The Potential of Phytogenics in Aquaculture. In: Steiner, T. (Edt.). Phytogenics in Animal Nutrition Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance. Nottingham University Press, UK, pp 147-156.

Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. 2009.Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in Fish. Fish Physiol. Biochem. 3: 519-539.

Esmaeili, M.A., Zohari, F., Sadeghi, H. 2009. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucriumpolium* on cell destruction in a model of streptozotocin induces diabetes. Plant Med. 75: 1418-1420.

Figueiredo-Silva, A.C., Corraze, G., Kaushik, S., Peleterio, J.B., Valente, L.M. 2010. Madulation of Black spot sea bream (*Pagellusbogaraveo*) intermediary metabolic pathway by dispensable amino acids. Amino Acids 39: 1401-1416.

Archive of SID
www.SID.ir

Materska, M. 2008. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-a review. Pol. J. Food Nutr. Sci. 58: 407-413.

Meton, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Canto, E., Fernandez, F., Baanante, I.V. 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysisgluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Brit. J. Nutr. 82: 223-232.

Meton, I., Fernandez, F., Baanante, I.V. 2003. Short and long term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparusaurata*). Aquaculture 225: 99-107.

Meton, I., Caseras, A., Fernandez, F., Baanante, I.V. 2004. Molecular cloning of glucose-6-phosphate catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparusaurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. Comp. Biochem. Physiol. B 138: 145-153.

Minassian, C., Tarpin, S., Mithieux, G. 1998.Role of Glucose-6 Phosphatase, Glucokinase and Glucose-6 phosphate in liver insulin resistance and its correction by metformin. Biochem. Pharmacol. 55: 1213-1219.

Oliva-Teles, A. 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. Aquaculture Int. 8: 477–492.

Panserat, S., Perrin, A., Kaushik, S. 2001. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). J. Nut. 132: 137-141.

Panserat, S. 2009.Molecular regulation of intermediary metabolism focusing on utilization of dietary carbohydrate. In: Overturf, K. (Ed.). Molecular Research in Aquaculture. Wiley-Blackwell, pp 261-278.

Panseart, S., Skiba-Cassy, S., Seiliez, I., Lansard, M., Planges-Juan, E., Vachot, C., Aguirre, P., Larroquet, L., Chaverance, G., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Moon, T.M. 2009. Metformin improves postparandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? Am. J. Physiol. Reg. 297: R707-R715.

Peres, H., Gonçalves, P., Oliva-Teles, A. 1999. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass

Gatlin III, D.M., Barrows, F.T., Brown, Dabrowski,P.K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, Hu, E.G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. Aquac. Res. 38: 551-579.

Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkine, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., Poutanen, K. 2010.Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. Int. J. Mol. Sci. 11: 1365-1402.

Hemre, G-I., Mommsen, T.P., Krogdahl, A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. Aquaculture Nut. 8: 175-194.

Henrique Fernandez, A.A., Barbosa Novelli, E.L., Okoshi, K., Politi, Okoshi, M., Di Muzio, B.P., Campos Guimaraes, J.F., Fernandes Junior, A. 2010. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. Biomed. Pharmacother. 64: 214-219.

Iynedjian, P.B. 2009. Molecular physiology of mammalian glucokinase.Cel. Mol. Life Sci. 66: 27.42.

Jung, U.J., Lee, M.K., Jeong, K.S., Choi, M.S. 2004. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. J. Nutr. 134: 2499-2503.

Kamalakkannan, N., Alnumair, K.S. 2009. Rutin alters fatty acid composition in diabetic tissues. Int. Nutr. Food Sci. 39: 655-662.

Kamalakannan, N., Prince, P.S.M. 2006.Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. Basic Clin.Pharmacol. 98: 97-103.

Kato, A., Minoshima, Y., Yamamato, J., Adachi, I., Watson, A.A., Nash, R.J. 2008. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. J. Agr. Food Chem. 56: 8206–8211.

Kohlmeier, M. 2006. Nutrient Metabolism. Academic Press, 829p.

Koven, W. 2002. Gilthead sea bream, *Sparusaurata*.In: Webster, C.D., Lim, C. (Eds.). Nutrient requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture. CABI Publishing, New York, pp 64–78.

Lee, M.S., Thuong, T.T. 2010. Stimulation of Glucose Uptake by Triterpenoids from *Weigelasubsessilis*.Phytother. Res. 24: 49-53.

Archive of SID
www.SID.ir

Spencer, J.P.E., El-Mohsen, M.M.A., Rice-Evans, C. 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. Arch. Biochem. Biophys. 423: 148-161.

Torres-Piedra, M., Ortiz-Andrade, R., Villalobos-Molina, R., Singh, N., Medina-Franco, J.L., Webster, S.P., Binnie, M., Navarrete-Vázque, G., Estrada-Soto, S. 2010. A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11β–Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. Eur. J. Med. Chem. 45: 2606-2612

Van Der Vusse, G.J., Reneman, R.S. 1995. Substarte utilization in mammalian cells. In: Bittar, E., Bittar, N. (Eds.). Cell Chemistry and Physiology Part I. Jai Press Inc., Hampton Hill, England, pp 45-75.

Walle, T. 2009. Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects. Int. J. Mol. Sci. 10: 5002-5019.

Wright, J.R.J.R., Bonen, A., Conlon, M., Pohajdak, B. 2000. Glucose homeostasis in the teleost fish tilapia: insights from brockmann body xenotransplantation studies. Integr. Comp. Biol. 40: 234-245.

(*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 179: 415-423.

Polakof, S., Miguez. J.M., Moon, T.W., Soengas, J.L. 2007. Evidence for the presence of a glucosensor in hypothalamus, hindbrain, and Brockmann bodies of rainbow trout. Am. J. Physiol. Reg.292: R1657–R1666.

Polakof, S., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Soengas, J.L. 2008. Altered dietary carbohydrates significantly affect gene expression of the major glucosensing components in Brockmann bodies and hypothalamus of rainbow trout. Am. J. Physiol. Reg. 295: R1077-R1088.

Polakof, S., Skiba-Cassy, S., Panserat, S. 2009. Glucose homeostasis is impaired by paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. Am. J. Physiol. Reg. I. 297: R1769-R17769.

Postic, C., Shiota, M., Magnuson, M.A. 2001.Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. Rec. Prog. Hormone Res. 56: 195-217.

Prabhakar, K.B., Doble, M. 2008. A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. Curr. Diabetes Rev. 4: 291-308.

Sharififar, F., Dehghan-Nudeh, G.h., Mirtajaldini, M. 2009. Major flavonoids from with antioxidant activity from *Teucriumpolium*. Food Chem. 112: 885-888.

Archive of SID

www.SID.ir