

اثر عصاره متانولی میوه گیاه قره قاط بر میزان گلوکز، شاخص‌های اکسیداتیو، کلسترول و HDL در رت‌های نر دیابتی

نویسندگان:

مینا فیروزه^۱، کهن شاهانی پور^{۱*}

۱- گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 13, No.4, Winter 2016

چکیده:

مقدمه: گیاه قره قاط (*Vaccinium arctostaphylos* L) یکی از گیاهان دارویی است که برای درمان دیابت استفاده می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات عصاره متانولی میوه گیاه قره قاط بر میزان گلوکز، شاخص‌های زیستی اکسیداتیو، HDL و کلسترول بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، در گروه‌های کنترل سالم، کنترل دیابتی و گروه‌های دیابتی تیمار شده با عصاره متانولی میوه گیاه قره قاط با دوزهای ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن تقسیم شدند. تأثیر ۳۰ روز تزریق درون صفاقی عصاره متانولی میوه قره قاط بر پارامترهای بیوشیمیایی خون بعد از القاء دیابت در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: مقایسه گروه‌های دیابتی تیمار با عصاره میوه گیاه قره قاط نشان داد که مؤثرترین غلظت در کاهش گلوکز، افزایش HDL، افزایش فعالیت پاراکسوناز، کاهش مالون دی‌آلدئید و کاهش وزن غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و مؤثرترین غلظت عصاره در کاهش کلسترول و کاهش پروتئین کربونیل غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی میوه گیاه قره قاط می‌تواند اثرات منفی دیابت روی بسیاری از فاکتورهای بیوشیمیایی را کاهش داده و نقش درمانی داشته باشد.

واژگان کلیدی: گلوکز، کلسترول، مالون دی‌آلدئید، پروتئین کربونیل، پاراکسوناز

Par J Med Sci 2015;13(4):23-32

مقدمه:

قرار گرفته است. نتایج حاصل از مطالعات نشان می‌دهد که افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد به علت هیپرگلیسمی در پاتوژنز و پیشرفت عوارض این بیماری نقش عمده‌ای دارد [۵]. رادیکال‌های آزاد در کنار مقادیر افزایش‌یافته گلوکز و لیپوپروتئین‌های موجود در خون باعث تشدید روند پراکسیداسیون یا گلیکوزیلاسیون می‌شوند. این روند به واکنش‌های سمی در سلول‌های اندوتلیال منجر شده و تجمع LDL سبب پیشرفت آترواسکلروز به‌عنوان یکی از عوارض مهلک دیابت می‌شود [۶]. استرس اکسیداتیو، در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از یک‌سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می‌شود که ممکن است نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی مقاومت انسولین، دیابت و عوارض ناشی از آن از طریق افزایش آسیب اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز و

دیابت به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان شناخته شده است. شیوع این بیماری رو به افزایش است؛ به‌طوری‌که تعداد مبتلایان از ۱۷۱ میلیون نفر در سال ۲۰۰۰ به بیش از ۳۶۶ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ خواهد رسید [۱]. اختلال عملکرد سلول‌های بتای لانگرهانس و مقاومت به انسولین نقش مهمی در ایجاد این بیماری دارد [۲]. دیابت از مهم‌ترین عوامل خطر برای برخی اختلال‌ها نظیر نفروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی-عروقی محسوب می‌شود [۳]. شیوع بیماری‌های قلبی-عروقی در بیماران دیابتی ۴-۲ برابر افراد سالم است [۴]. در سال‌های اخیر ارتباط عوارض مهلک دیابت با افزایش سطح گلوکز، پروفایل لیپیدی خون، کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه افزایش میزان واکنش‌های اکسیداتیو در بدن مورد بررسی

* نویسنده مسئول، نشانی: اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

پست الکترونیک: shahanipur_k@yahoo.com

تلفن تماس: ۰۹۱۳۲۸۸۹۳۲۴

پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰

اصلاح: ۱۳۹۴/۱۰/۱۶

دریافت: ۱۳۹۴/۵/۸

توسط سلول‌ها [۱۹] و مهار گلوکونوژنز در کبد [۲۰]. آنتوسیانین‌ها از مهم‌ترین ترکیبات این گیاه هستند. بررسی‌های روی متابولیت‌های این گیاه توسط نیک آور و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد میوه‌های رسیده قره قاط حاوی سه آنتوسیانین اصلی هستند و در نتیجه این گیاه را می‌توان به‌عنوان یک گیاه دارویی مهم در نظر گرفت [۲۱]. در رت‌های دیابتی میزان قند خون در اثر کاهش انسولین ناشی از استرپتوزوتوسین افزایش می‌یابد [۲۲]. استرپتوزوتوسین ماده‌ای است که توسط استرپتومایسز آکرو موژنز سنتز [۲۳] و باعث اختلال در اکسیداسیون گلوکز و همچنین کاهش ساخت و ترشح انسولین می‌شود. استرپتوزوتوسین توسط سلول‌های بتا پانکراس به‌وسیله GLUT2 برداشت می‌شود و بدین طریق وارد این سلول‌ها شده و آسیب بافتی ایجاد می‌کند. نتایج عمل سمی استرپتوزوتوسین در سلول بتا پانکراس، ناشی از تغییرات ایجاد شده در DNA سلولی است. آزمایش‌های اخیر نشان داده است که اصلی‌ترین دلیل تخریب و مرگ این سلول‌ها به سبب آلکیلاسیون DNA آن‌ها است [۲۴-۲۵]. از آنجاکه انسولین در متابولیسم لیپیدها مؤثر است، این اختلال سبب افزایش میزان تری گلیسیرید سرم می‌شود. با توجه به رابطه عکس غلظت TG با HDL، کاهش مقادیر HDL و افزایش LDL در رت‌های دیابتی دور از انتظار نیست [۲۲]. HDL لیپوپروتئینی با چگالی بالا است که در بیماری‌های قلبی - عروقی نقش مهمی ایفا کرده و غلظت پایین آن یکی از مهم‌ترین عوامل خطر این‌گونه بیماری‌هاست [۲۶]. در افراد مبتلا به دیابت نوع دو مقدار HDL کاهش می‌یابد و می‌تواند LDL را در مقابل آسیب اکسیداتیو محافظت کرده و از ایجاد LDL اکسیدشده جلوگیری کند [۲۷-۲۸]. در مطالعه لی و همکاران در سال ۲۰۰۸ استفاده از گونه‌ای از قره قاط به اسم Vaccinium macrocarpon با دوز ۱۵۰۰ میلی‌گرم روزانه برای ۱۲ هفته در بیماران دیابتی نوع دو نشان‌دهنده کاهش میزان LDL و کلسترول تام و همچنین افزایش میزان HDL بود [۲۹]. هدف ما از انجام این تحقیق تعیین اثر عصاره متانولی گیاه قره قاط بر میزان شاخص‌های زیستی اکسیداتیو مانند مالون دی آلدئید، فعالیت پاراکسوناز و پروتئین کربونیل و همچنین میزان گلوکز، LDL و کلسترول در رت‌های دیابتی نر بود.

روش کار:

در این مطالعه تجربی ابتدا میوه گیاه قره قاط توسط کارشناس مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اصفهان مورد شناسایی قرار گرفت. میوه‌ها پس از پودر شدن، به روش خیساندن و به کمک حلال متانول ۷۰٪ عصاره گیری شدند. به‌منظور انجام آزمایش از ۲۴ سر موش صحرایی نر بالغ با نام علمی *Ratus norvegicus*

عوارض تأخیری دیابت داشته باشد [۷]. کربونیل شدن، یک تغییر شکل برگشت‌ناپذیر به‌وسیله استرس اکسیداتیو است که اغلب منجر به از دست دادن عملکرد و تغییر فعالیت زیستی پروتئین‌ها و تشکیل پروتئین کربونیل (PC) اکسیداتیو می‌شود [۸]. اکسیداسیون LDL از دیگر عوارض افزایش رادیکال‌های آزاد است که به‌عنوان یک مرحله کلیدی برای شروع روند آترواسکلروز شناخته شده است. پاراکسوناز ۱ آنزیمی استراز با اثر آنتی‌اکسیدانی متصل به HDL است که با آسیب‌های اکسیداتیو لیپیدها مقابله می‌کند و یکی از عملکردهای فیزیولوژیک طبیعی آن در متابولیسم لیپیدهای اکسیدی سمی LDL و HDL است. این آنزیم از تشکیل LDL اکسیدشده جلوگیری می‌کند و فسفولیپیدهای مشتق از LDL اکسید را غیرفعال و نقش آن را در بیماری‌های قلبی - عروقی توجیه می‌کند. دیابت، بیماری‌های تیروئید، سندروم متابولیک، نارسایی کلیوی و افزایش سن با فعالیت کاهش‌یافته پاراکسونازها مرتبط هستند [۹، ۱۰]. ارتباط بالا رفتن قند خون با پراکسیداسیون لیپیدها در مطالعات مختلفی بررسی شده است. پاساگلا و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که میزان مالون دی آلدئید در بیماران دیابتی نوع دو افزایش قابل‌توجهی دارد [۱۱]. این ماده در طی بیوسنتز پروستاگلاندین‌ها در متابولیسم آراشیدونیک اسید به دست می‌آید و پس از ایجاد در سلول‌ها با آمینواسیدهای پروتئین‌ها و دیگر بیومولکول‌ها واکنش داده و ترکیبات موتاژن عامل ایجاد سرطان ایجاد می‌کند [۱۲]. با توجه به عوارض متعدد، یافتن درمان مناسبی برای آن ضروری است. استفاده از گیاهان دارویی برای درمان دیابت از دیرباز رایج بوده و امروزه به‌عنوان یک طب جایگزین مطرح است [۱۳]. کارایی این گیاهان در پایین آوردن قند خون و استقبال مردم از آن‌ها، کاربرد این گیاهان را در جامعه تسهیل کرده است. باین‌حال، تجویز منطقی گیاهان دارویی نیازمند داشتن اطلاعات دقیق از سازوکار عمل آن‌ها است [۱۴]. قره قاط یا سیاه‌گیله از جمله گیاهانی است که در طب سنتی برای آن اثر ضد دیابتی ذکر شده است. تحقیقات زیادی روی خواص دارویی دو گونه شاخص آن با نام‌های علمی *Vaccinium myrtillus* و *Vaccinium arctostaphylos* انجام شده است [۱۵]. در ایران تنها گونه دوم می‌روید و می‌توان آن را در ارتفاعات استان اردبیل پیدا نمود. شواهد تجربی حاکی از تأثیر این گیاه در پایین آوردن قند خون حیوانات نرمال و موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان یا استرپتوزوتوسین است [۱۶-۱۷]. در مطالعات انجام‌شده روی انسان نیز اثر ضد دیابتی قره قاط تأیید شده است [۱۸]. سازوکارهایی که تاکنون برای نحوه پایین آوردن قند خون توسط قره قاط پیشنهاد شده‌اند عبارت‌اند از: مهار جذب گلوکز از روده، افزایش برداشت گلوکز

اضافه شد. ایندورف ها یک ساعت در تاریکی قرار داده شدند و در مرحله بعد به هر دو ایندورف تری کلرواستیک اسید TCA ۲۰ درصد سرد اضافه شد تا پروتئین‌ها رسوب دهند. سپس محتویات هر دو ایندورف به مدت سه دقیقه در دمای ۸ تا ۱۰ درجه سلسیوس در ۱۱۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و محلول رویی آن‌ها دور ریخته و به پلیت تشکیل شده در هر ایندورف در سه مرحله ترکیب اتانول/ اتیل استات اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸ تا ۱۰ درجه سلسیوس در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. محلول رویی فرایند سانتریفیوژ دور ریخته شد. در پایان، سه مرحله به پلیت تشکیل شده گوانیدینوم هیدروکلراید شش مولار اضافه و با قرار دادن در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۷۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت پروتئین کربونیل محاسبه شد [۳۰].

به‌منظور ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، مولکول مالون دی آلدئید به‌عنوان شاخصی از لیپیدها تحلیل شد. تحت شرایط اسیدی و دمای ۹۵ درجه سلسیوس یک مولکول مالون دی آلدئید با دو مولکول تیوباربیتوریک اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی‌رنگی ایجاد می‌کند. در ابتدا پروتئین سرم با استفاده از تری کلرواستیک اسید رسوب داده شد و پس از جدا شدن به‌وسیله سانتریفیوژ از محلول صاف‌شده برای اندازه‌گیری مالون دی آلدئید با روش اسپکتروفتومتری جذب نوری کمپلکس رنگی در طول موج ۵۴۵ نانومتر استفاده شد [۳۱].

فعالیت ارگانوفسفات هیدرولازی یا همان پاراکسونازی آنزیم PON-1 با استفاده از محاسبه سرعت اولیه هیدرولیز سوبسترای پاراکسون به پارانتروفنول تعیین می‌شود. به این منظور ابتدا بر اساس پروتکل Beltowski محلولی شامل ۱۰۰ میلی مولار از تریس هیدروکلریک اسید و ۲ میلی مولار کلسیم کلراید در غلظت نهایی ۲ میلی مولار پاراکسون تهیه و pH آن روی ۸ تنظیم می‌شود (مخلوط سنجش). در نهایت، با اضافه کردن ۲۰ میکرو لیتر از سرم حاوی آنزیم به این مخلوط در کووت (شرایط پایدار) میزان تشکیل P-nitro phenol در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مونیتر خواهد شد. تمام آزمایش‌ها دو بار تکرار می‌شوند. در پایان، با استفاده از فرمول زیر فعالیت سرم پاراکسونازی آنزیم PON-1 بر حسب میکرو مول بر سانتی‌متر محاسبه خواهد شد [۳۲].

$$A / T.F = \text{فعالیت آنزیم پاراکسوناز}$$

$$F = (VT/VS) / \epsilon \cdot 412$$

$$VT = \text{حجم کل (میکرو لیتر)}, VS = \text{حجم نمونه (میکرو لیتر)},$$

$$A = \text{تغییر در جذب}, T = \text{زمان (دقیقه)}$$

$$412 \text{ ضریب خاموشی مولار پاراکسوناز برمول در سانتی‌متر (} \cdot 10^4 / 1829 \text{)}.$$

allivias از نژاد ویستار با وزن ابتدایی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. ابتدا رت‌ها در لانه حیوانات در شرایط مناسب دمایی ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت، نور و تهویه مناسب نگهداری شدند. در تمام مدت موش‌ها با غذای استاندارد تغذیه می‌شدند و محدودیتی در دسترسی به آب و غذا نداشتند. کار با حیوانات در تمام مراحل تحقیق مطابق با دستورالعمل آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان بود.

ایجاد دیابت تجربی

برای دیابتی نمودن موش‌های صحرایی از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) (سیگما، امریکا) به‌صورت تک‌دوز و با یک‌بار تزریق داخل صفاقی به میزان ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حل‌شده در محلول نرمال سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد. سه روز بعد از تزریق، برای تأیید دیابت، میزان قند خون ناشتا با استفاده از دستگاه گلوکومتر و یک قطره خون از دم رت اندازه‌گیری شد. موش‌هایی که غلظت گلوکز خون آن‌ها بالای ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر بود به‌عنوان مبتلا به دیابت در نظر گرفته‌شده و به مرحله بعدی برای شروع تیمار راه یافتند. میزان وزن حیوانات قبل از انجام کار و در طی چهار هفته اندازه‌گیری شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه شش‌تایی تقسیم و هر گروه در قفس جداگانه نگهداری شدند. گروه اول (گروه سالم یا کنترل منفی غیر دیابتی) با نرمال سالین تیمار شدند. گروه دوم (کنترل مثبت دیابتی) استرپتوزوتوسین دریافت کردند، ولی عصاره به آن‌ها تزریق نشد. گروه سوم و چهارم، رت‌های دیابتی شده تحت تیمار با عصاره متانولی قره قاط به ترتیب با دوز ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی و روزانه بودند. شروع مداخلات سه روز پس از دیابتی شدن رت‌ها آغاز و تا سی روز ادامه داشت. بعد از این زمان، حیوانات توسط کتامین بی‌هوش و خون‌گیری از قلب آن‌ها برای ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی بعد از جدا کردن سرم انجام شد.

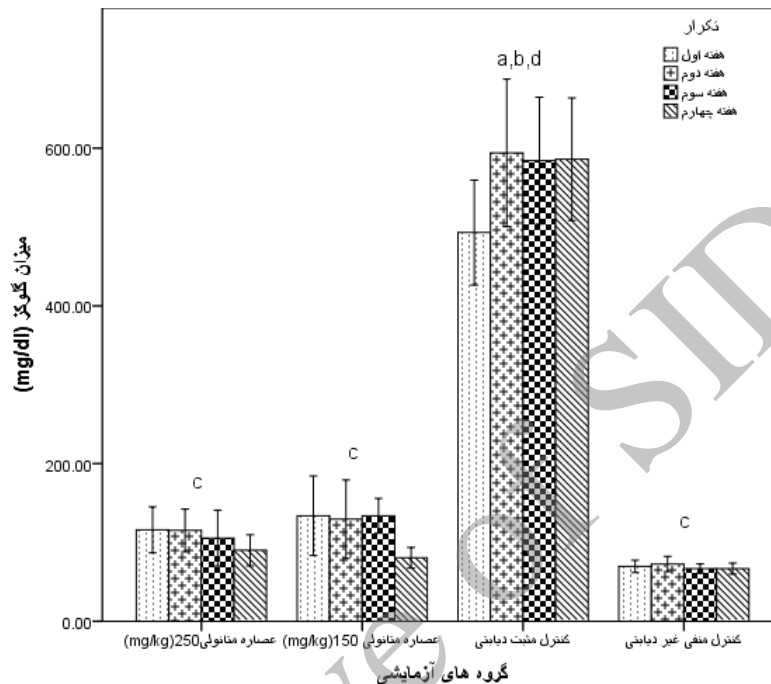
اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی

اندازه‌گیری HDL و کلسترول با روش فتومتریک و با استفاده از کیت پارس آزمون و تعیین وزن در ابتدا و انتهای مطالعه انجام شد. همچنین میزان گلوکز سرم نیز در انتهای هر هفته اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری پروتئین کربونیل موجود در سرم نمونه‌ها ابتدا از دو ایندورف دو میلی‌لیتری مجزای Sample و Blank استفاده شد و بعد از رقیق‌سازی نمونه‌های سرم با سرم فیزیولوژی تزریقی به نسبت ۴:۱ به محتویات ایندورف، به هر کدام ۵۰۰ میکرو لیتر DNP حل‌شده در HCL دو نرمال اضافه شد. به ایندورف Blank فقط ۵۰۰ میکرو لیتر HCL دو نرمال

یافته ها:

نتایج بررسی حاضر نشان داد تجویز عصاره متانولی میوه قره قاط به موش‌های دیابتی دارای اثر هیپوگلیسمیک بوده و سطح گلوکز سرم در گروه دیابتی تحت درمان با این عصاره در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری تغییر کرده است (نمودار ۱).

برای بررسی تفاوت معنادار بین میانگین‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه میانگین وزن ابتدا و پایان دوره و میانگین گلوکز سرم رت‌ها در چهار هفته پیاپی از روش اندازه‌گیری‌های مکرر در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. اختلاف‌ها به‌شرط $P < 0.05$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.



نمودار ۱: میانگین گلوکز سرم در گروه‌های مورد مطالعه در چهار هفته متوالی نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار مقدار بیان شده است.

a: تفاوت آماری معنادار با گروه عصاره متانولی ۲۵۰؛ b: تفاوت آماری معنادار با گروه عصاره متانولی ۱۵۰؛ c: تفاوت آماری معنادار با گروه کنترل مثبت دیابتی؛ d: تفاوت آماری معنادار با گروه کنترل منفی غیر دیابتی

جدول ۱: مقایسه فاکتورهای بیوشیمیایی در گروه‌های آزمایشی تیمار با عصاره متانولی قره قاط و کنترل دیابتی و غیر دیابتی مقایسه میانگین شاخص‌های بیوشیمیایی در چهار گروه مورد بررسی

گروه‌ها	تیمار با عصاره متانولی ۲۵۰ mg/kg	تیمار با عصاره متانولی ۱۵۰ mg/kg	کنترل مثبت دیابتی	کنترل منفی غیر دیابتی
کلسترول (mg/dl)	180.83 ± 4.71^d	72.0 ± 6.57	110.0 ± 20.27	182.64 ± 6.60^a
HDL (mg/dl)	$3.67 \pm 44.67^{b,c}$	$33.17 \pm 6.52^{a,c,d}$	$23.80 \pm 4.21^{a,b,d}$	$3.76 \pm 49.17^{b,c}$
پروتئین کربونیل (nmol/mg)	$5.32 \pm 18.88^{c,d}$	$15.37 \pm 3.08^{c,d}$	$32.81 \pm 6.67^{a,b,d}$	$5.54 \pm 3.32^{a,b,c}$
مالون دی‌آلدئید ($\mu\text{mol/dl}$)	$0.763 \pm 0.084^{c,d}$	$0.83 \pm 0.025^{c,d}$	$0.93 \pm 0.078^{a,b,d}$	$0.23 \pm 0.026^{a,b,c}$
پاراکسوناز ($\mu\text{u/l}$)	165.66 ± 20.15^c	$150.93 \pm 10.28^{c,d}$	$98.90 \pm 12.82^{a,b,d}$	$170.67 \pm 17.40^{c,b}$

نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار مقدار بیان شده است.

a: تفاوت آماری معنادار با گروه عصاره متانولی ۲۵۰؛ b: تفاوت آماری معنادار با گروه متانولی ۱۵۰

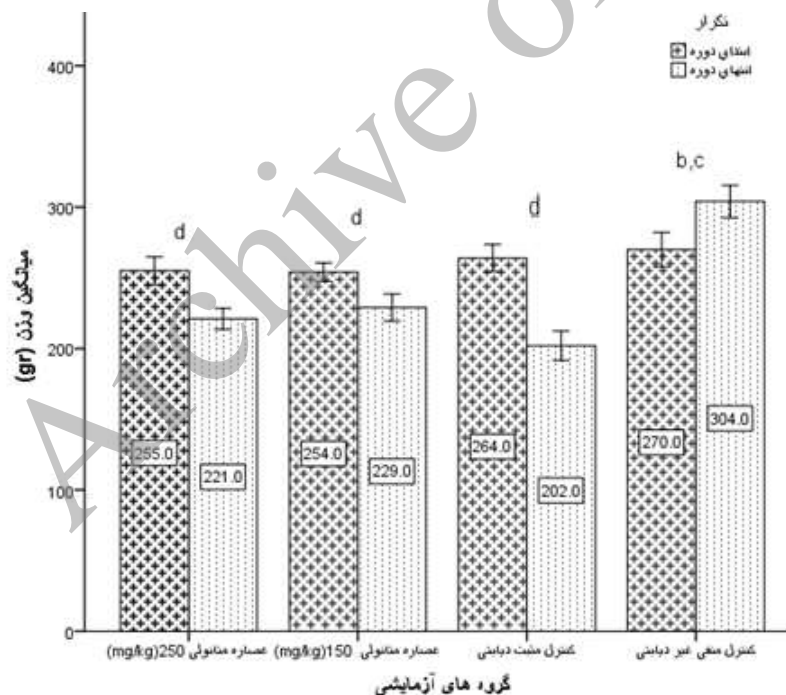
c: تفاوت آماری معنادار با گروه کنترل مثبت دیابتی؛ d: تفاوت آماری معنادار با گروه کنترل منفی غیر دیابتی

نتایج حاصل از تزریق عصاره میوه گیاه قره قاط و مقایسه بین این گروه‌ها در جدول ۱ تأثیر معناداری را در میزان کلسترول،

معنادر دارند (جدول ۱). نتایج حاصل از مقایسه فعالیت آنزیم پاراکسوناز بین گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد که گروه تیمار عصاره متانولی در غلظت بالا با گروه کنترل دیابتی و همچنین گروه تیمار با عصاره متانولی در غلظت پایین با گروه‌های شاهد تفاوت معنادار و گروه‌های شاهد نیز با هم تفاوت معنادار دارند ($P < 0.05$) (جدول ۱).

وزن رت‌ها در این مطالعه در دو زمان ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. میانگین وزن رت‌ها در چهار گروه مورد بررسی به‌طور معناداری تغییر کرده است. مقایسه میانگین وزن رت‌ها بین گروه‌های آزمایشی و کنترل نشان می‌دهد تیمار با عصاره توانسته است کاهش وزن رت‌های دیابتی را تا حدودی جبران کند. نتایج حاصل از مقایسه بین گروه‌های آزمایشی نشان می‌دهد که گروه‌های تیمار عصاره متانولی در هر دو غلظت و گروه کنترل مثبت دیابتی تنها با گروه کنترل غیر دیابتی (شاهد) تفاوت معناداری دارند. همچنین گروه شاهد غیر دیابتی با همه گروه‌های آزمایشی تفاوت معناداری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

HDL، پروتئین کربونیل، مالون دی آلدئید و فعالیت آنزیم پاراکسوناز نشان می‌دهد. همچنین نتایج بیانگر آن است که عصاره متانولی میوه قره قاط دارای اثر هیپولیپیدمی بوده و میزان کلسترول سرم در گروه دیابتی تحت درمان با عصاره متانولی با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (غلظت بالا) در مقایسه با گروه کنترل منفی غیر دیابتی (شاهد غیر دیابتی) تفاوت معناداری دارد ($P < 0.05$). یافته‌ها حاکی از آن است که میزان HDL در گروه تیمار با غلظت بالا عصاره متانولی قره قاط نسبت به گروه کنترل مثبت دیابتی (شاهد دیابتی) و گروه تیمار با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (غلظت پایین) تفاوت معناداری دارد و همچنین گروه تیمار با غلظت پایین با گروه‌های شاهد و گروه تیمار با غلظت بالا تفاوت معنادار است. گروه شاهد دیابتی نسبت به گروه‌های آزمایشی تیمار شده در هر دو غلظت و گروه شاهد غیر دیابتی و همچنین گروه شاهد غیر دیابتی با گروه تیمار با غلظت کم و شاهد دیابتی تفاوت معناداری دارند. در خصوص پروتئین کربونیل و مالون دی آلدئید مقایسه بین گروه‌های تیمار در هر دو غلظت با گروه‌های کنترل وجود تفاوت معنادار را نشان می‌دهد و گروه‌های شاهد نیز با یکدیگر تفاوت



نمودار ۲: میانگین وزن در گروه‌های مورد مطالعه در ابتدا و انتهای دوره

نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار مقدار بیان شده است.

a: تفاوت آماری معنادار با گروه عصاره متانولی ۲۵۰؛
 b: تفاوت آماری معنادار با گروه متانولی ۱۵۰؛
 c: تفاوت آماری معنادار با گروه کنترل مثبت دیابتی؛
 d: تفاوت آماری معنادار با گروه کنترل منفی غیر دیابتی

بحث:

مشتقات پروتئین کربونیل به‌عنوان یک نشانگر اولیه و پایدار برای اکسیداسیون پروتئین در بدن می‌شود. افزایش سطح پروتئین کربونیل در رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین در تحقیق‌های مختلف گزارش شده است که با نتایج مطالعه حاضر در گروه کنترل مثبت دیابتی بدون تیمار با عصاره قره قاط هماهنگ است [۳۶]. مطالعات نشان داده‌اند مهار فرآیندهای اکسیداتیو در بیماران دیابتی می‌تواند از بروز و گسترش عوارض تأخیری در این بیماران بکاهد؛ از این رو مکمل یاری با ترکیبات زیست فعال غذایی از جمله فیتوکمیکال های آنتی‌اکسیدان می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش استرس اکسیداتیو و عوارض ناشی از آن باشد. همچنین استفاده از مواد دارای خواص آنتی‌اکسیدانی در مهار PC یک چالش جدید در درمان بیماری‌های مرتبط با استرس کربونیل دار از قبیل بیماری دیابت و ناراحتی‌های سندرم متابولیک است [۳۷]. در مطالعه بیگدلی و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز مصرف فلاونوئید کوئرستین و ورزش هوازی، به‌طور قابل توجهی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین افزایش داد. همچنین ورزش، میزان PC را در رت های دیابتی کاهش داده، درحالی‌که این تغییرات در گروه دیابتی درمان شده با فلاونوئید کوئرستین همراه با ورزش هوازی بالاتر بوده است [۳۸]. با توجه به این‌که قره قاط دارای خواص آنتی‌اکسیدانی نسبتاً قوی [۳۹] و میوه آن سرشار از کوئرستین و ایزو کوئرستین است [۴۰]، علت کاهش پروتئین کربونیل در گروه‌های تیمار شده با عصاره میوه قره قاط را می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و فلاونوئید کوئرستین در این گیاه مربوط دانست. شرایطی مانند دیابت، بیماری‌های تیروئید، سندرم متابولیک، نارسایی کلیوی و افزایش سن در ارتباط با فعالیت کاهش‌یافته پاراکسوناز ها است [۴۱-۴۲]. کوئرستین از جمله فلاونوئیدهایی است که تأثیر مثبت آن بر فعالیت آنزیم PON 1 در حالت *in vivo* و *in vitro* گزارش شده است [۴۳]. تاکنون مطالعات گوناگون روی اثر میوه‌های مختلف که مخلوطی از فلاونوئیدها و ترکیبات مؤثر دیگر هستند بر فعالیت این آنزیم انجام شده است. برای مثال تجویز آب انار برای موش‌های صحرایی با نقص APO E موجب افزایش ۴۳٪ فعالیت پاراکسونازی شده است [۴۴]. فلاونوئیدها که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند می‌توانند فعالیت آنزیم پاراکسوناز را افزایش داده و در پیشگیری از آترواسکلروز تأثیر به‌سزایی داشته باشند. مطالعات محدودی خاصیت آنتی‌اکسیدانی برخی از فلاونوئیدها بر فعالیت آنزیم PON 1 را بررسی کرده‌اند [۴۵]. به نظرمی رسد وجود ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه قره قاط توانسته است میزان فعالیت سرمی آنزیم پاراکسوناز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد که با مطالعات اوپرام و

به‌طور خلاصه نتایج پژوهش حاضر نشان داد عصاره میوه گیاه قره قاط اثرات مثبتی بر روی بهبود اختلالات پروفایل لیپیدی و بهبود اختلالات متابولیسمی گلوکز در رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین داشته است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره میوه قره قاط میزان گلوکز، کلسترول، پروتئین کربونیل و مالون دی آلدئید در رت های دیابتی تحت تیمار با عصاره را نسبت به گروه دیابتی بدون تیمار به‌طور معناداری کاهش ولی میزان HDL و فعالیت پاراکسوناز را به‌طور معناداری افزایش داده است. مطالعات انجام‌شده توسط تاکی کاوا و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی گیاه قره قاط نشان داد که این گیاه محتوی مقدار زیادی آنتوسیانوزوئیدها است. آنتوسیانوزوئیدها کمپلکس‌های بیوفلاونوئیدی در قره قاط هستند که خواص متعددی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و ضدالتهابی دارند. نتایج این پژوهش روی موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو حاکی از آن است که رژیم غذایی حاوی عصاره قره قاط هیپرگلیسمی را از طریق فعال‌سازی پروتئین کیناز فعال‌کننده AMP (AMPK) بهبود می‌بخشد [۳۳]. در مطالعات انجام‌شده روی انسان توسط ابیدو و همکاران در سال ۲۰۰۶ و واتسون در سال ۱۹۲۸ اثر ضد دیابتی قره قاط تأیید شده است [۱۸،۳۴]. میوه قره قاط به علت وجود ذخایر غنی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از افزایش اکسیداسیون لیپیدی بعد از القاء دیابت پیشگیری کرده و وجود فلاونوئیدها در این گیاه باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود که علت کاهش سطح مالون دی آلدئید را در گروه‌های تیمار با عصاره نسبت به گروه کنترل مثبت دیابتی توجیه می‌کند. کاهش غلظت مالون دی آلدئید به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو پلاسما در پاسخ به *Vaccinium arctostaphylos* را به‌احتمال زیاد می‌توان به ترکیبات پلی فنلی این گیاه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی آن ربط داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که می‌توان این گیاه را به‌عنوان یک دارو برای پیشگیری از تصلب شرائین در بیماران در معرض خطر از جمله افراد هیپرلیپیدمی مدنظر قرار داد. مهار اکسیداسیون LDL از طریق جلوگیری از استرس اکسیداتیو در پیشگیری از توسعه آترواسکلروز مفید است که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۳۵]. در مطالعه لی و همکاران در سال ۲۰۰۸ استفاده از یکی از گونه‌های از قره قاط به اسم *Vaccinium macrocarpon* به‌صورت روزانه برای بیماران دیابتی نوع دو منجر به کاهش میزان LDL و کلسترول تام و همچنین افزایش میزان HDL شد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد [۲۹]. قند خون بالا در دیابت می‌تواند میزان گلیکاسیون و آسیب اکسیداتیو پروتئین‌های داخل سلولی و پلاسما را افزایش داده و منجر به تولید نیترو تیروزین و

این که گیاهان دارویی نسبت به ترکیبات شیمیایی اثرهای جانبی به نسبت کمتری دارند، می‌توان با انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه اثر بالینی این عصاره‌ها، از این گیاهان به‌عنوان جایگزین‌های شایسته داروهای شیمیایی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله منتج از طرح پژوهشی و پایان‌نامه کارشناسی ارشد بوده و بدین‌وسیله از مسئولان محترم پژوهشی آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان اصفهان به خاطر مساعدت در انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض و منافع:

نویسندگان هیچ تعارض منافع با توجه به تالیف و / یا انتشار این مقاله اعلام نکرده‌اند

بویج سعادتمندی هماهنگ است. پلی ساکاریدها، فلاونوئیدها، گلیکوپروتئین و پلی پپتیدها، استروئیدها، آلکالوئیدها و پکتین موجود در گیاهان دارویی می‌توانند خاصیت هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک احتمالی برخی از گیاهان مورد استفاده در درمان دیابت از جمله قره قاط در تحقیق حاضر را از نظر جلوگیری از تغییرات بیوشیمیایی خون به‌خوبی توجیه کنند.

نتیجه‌گیری:

نتایج پژوهش حاضر نشان داد عصاره میوه گیاه قره قاط تأثیر مثبتی روی بهبود اختلال پروفایل لیپیدی، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما و بهبود اختلال متابولیسمی گلوکز در رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوسین دارد. عصاره این میوه در کنترل دیابت و اختلال چربی‌ها نقش داشته و قادر است استرس اکسیداتیو را از طریق کاهش مالون دی‌آلدئید و پروتئین کربونیل و فعال‌سازی آنزیم پاراکسوناز کاهش دهد. با توجه به

References:

- Mohammadi Karizno F, Saghebjo M, Foadoddini M, et al. The role of aerobic training and Pistacia atlantica extract on the levels of protein carbonyl, heat shock protein 70, and glycogen in the liver tissue of diabetic rats. J of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (1):35-47. (Persian)
- Chao M, Zou D, Zhang Y, et al. Improving insulin resistance with traditional Chinese medicine in type 2 diabetic patients Endocrine. 2009; 36(2): 268-74.
- Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Med Sci Monit. 2006; 12(7): RA130-47.
- Mirfeizi M, Mehdizadeh Tourzani Z, Rezvani H, et al. The effects of whortleberry on controlling of blood glucose and lipids in patients with type II diabetes: A randomized controlled trial. J Army Univ Med Sci 2012; 10 (3) : 225-231. (Persian)
- Torros MD, Canal JR, Perez C. Oxidative stress in normal and diabetic rats. Physiol. Res 1999; 8:203-208.
- Sandra RA, Rauscher FM, Watkins JB. Effect of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin- Induced diabetic rats. J Biochem.Molec Toxicol 2001;5:143-149.
- Sadi G, Kartal DI, Guray T. Regulation of glutathione S-transferase Mu with type 1 diabetes and its regulation with antioxidants. Turk J Biochem 2013; 38(1): 92-100.
- Dennis KE, Hill S, Rose KL, et al. Augmented cardiac formation of oxidatively-induced carbonylated proteins accompanies the increased functional severity of post-myocardial infarction heart failure in the setting of type 1 diabetes mellitus. Cardiovasc Pathol 2013; 22(6): 473-80.
- Precourt LP, Amre D, Denis MC, et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. Atherosclerosis. 2011;214:20-36.
- Azizi F, Raiszadeh F, Solati SM. Serum lipids, lipoproteins and apolipoproteins and paraoxonase enzyme activity in patients with thyroid dysfunction. Iran J Endocrinology & Metab 2001;3:11-22. (Persian)
- Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. Tohoku J Exp Med 2004; 203:211-218.
- Jetawattana S. Malondialdehyde(MDA), a lipid oxidation product. Free Radicals in Biology and Medicine The University of Iowa 2005;72(222):1-11.
- Hasani-Ranjbar S, Larijani B, Abdollahi M. A systematic review of Iranian medicinal plants useful in diabetes mellitus. Arch Med Sci 2008; 4: 285-92.
- Shafiee-Nick R, Parizadeh SMR, Karimi A. Evaluation of the effect of aqueous-alcoholic extract of teucrium polium on insulin secretion

- from isolated rat pancreatic islets. *J Rafsanjan Uni Med Sci* 2008 ; 7: 5-12(Persian)
15. Shafiee-Nick R, Parizadeh M R, Zokaei N, et al. Effect of hydro-alcoholic extract of *Vaccinium arctostaphylos* on insulin release from rat-isolated langerhans islets. *komesht* 2011;12:4(40). (Persian).
 16. Roghani M, Balouchnejad Mojarad T, Taheri S. Effect of oral consumption of areal parts of *Vaccinium myrtillus* on blood glucose and lipids of diabetic rats. *Iran J Diabetes Lipid* 2007;7: 151-158 (Persian).
 17. Allen FM. Blueberry leaf extract: physiologic and clinical properties in relation to carbohydrate metabolism. *JAMA* 1927; 89: 1577-1581.
 18. Abidov M, Ramazanov A, Jimenez Del Rio M, et al. Effect of Blueberin on fasting glucose, C-reactive protein and plasma aminotransferases, in female volunteers with diabetes type 2: double-blind, placebo controlled clinical study. *Georgian Med News*,2006; (141):66-72.
 19. Cheng Juei - T, Liu M. Stimulatory effect of caffeic acid on alpha-adrenoreceptors to increase glucose uptake in cultured C1C2 cells, *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*,2000; 362(2):122-7.
 20. Arion W J., Canfield W K, Ramos FC, et al. Chlorogenic acid analogs : potent competitive inhibitor of the hepatic glucose 6-phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 1998;351:279-285.
 21. Nickavar.B., Salehi-Sormagi. M.H, Amin Gh., et al. Steam volatiles of *Vaccinium arctostaphylos* L, *Pharm.Biol* 2002; 40(6) : 448-449.
 22. Richard W. Nesto,MD. LDL cholesterol lowering in type 2 diabetes : what is the optimum approach?. *Clin Diab*2008;26(1): 8-13.
 23. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *physiol Res* 2001; 50:536 -546.
 24. Thulesen J, Orskov C, Holst JJ, et al. Short-term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinol* 1997; 138: 62-68.
 25. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000; 43:1528-1533.
 26. Mackness MI, Mackness B, and Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler Suppl* 2002; 3: 49 - 55.
 27. Mackness B, Davies GK, Turkie W, et al. paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1451 - 1457.
 28. Aviram M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1301-1303.
 29. Lee I.T,Chan Y.C, Lin C.W,et al. Effect of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with type 2 diabetes. *Diabetic Med* 2008;25(12),1473-1477.
 30. Abram Z, Reznic K,Packer L. Oxidative damage to protein : Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-363.
 31. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD,et al. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid peroxides in human plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:331-5. (Persian)
 32. Hamidia Z, Nayeri H, Naderi GHA,et al. The effect of some flavonoids on paraoxonase-1 activity. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2014; 16(4):71-76(Persian).
 33. Takikawa M, Inoue S, Horio F, et al. Dietary anthocyanin- rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP –activated protein kinase in diabetic mice. *J Nutr* 2010 ;140(3):527-33.
 34. Watson EM. Some observations on the effect of blueberry leaf extract in diabetes mellitus. *Can Med Assoc J* 1928; 19:166-171.
 35. Soltani R, Hakimi M, Asgary s,et al. Evaluation of Effects of *Vaccinium arctostaphylos* L. Fruit Extract on Serum Lipids and hs –CRP Levels and Oxidative Stress in Adult Patients with Hyperlipidemia :A Randomized, Double- Blind, Placebo – Controlled Clinical trial, Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)J. Hindawi Publishing Corporation 2014; Article ID 217451, 6 Pages.
 36. Mohammadi Karizno F, Saghebjo M, Foadoddini Met al. The role of aerobic training and *Pistacia atlantica* extract on the levels of protein carbonyl, heat shock protein 70, and glycogen in the liver tissue of diabetic rats. *J Birjand Univ Med Sci* 2014; 21 (1): 35-47.
 37. Suzuki YJ,Carin M, Buttrfield DA. Protein carbonylation. *Antioxid Redox Signal* 2010.12(3):323-5.
 38. Bigdeli Y, Heidarianpour A. Effect of regular exercise and vitamin C on pain threshold in diabetic rats. *J Arak Univ Med Sci* 2012;15(4): 10-17. (Persian).
 39. Zarban A, Malekane M, Najary M. Evaluation of antioxidant properties of 28 medicinal plants. *Birjand J Med Sci* 2004; 11: 9-15.
 40. Rajabian T, Fallah Hosseini H. Effect of fruit juice and pomegranate seed oil on blood lipid levels and progression of atherosclerosis in

- hypercholesterolemic rabbits. *J Med Plants* 2007;7:93-104.
41. Azizi F, Rahmani M, Raiszadeh F, et al. Association of lipids lipoproteins, apolipoproteins and paraoxanase enzyme activity with premature coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2002;13:9-16.
42. Precourt LP, Amre D, Denis MC, et al. The three -gene paraoxonase family: physiologic roles actions and regulation. *Atheroscler* 2011; 214:20-36.
43. Boesch-Saadatmandi C, Egert S, Schrader C, et al. Effect of quercetin on paraoxonase 1 activity--studies in cultured cells, mice and humans. *J Physiol Pharmacol.* 2010; 61(1): 99-105.
44. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic polipoprotein E-deficient mice. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(5): 1062-76.
45. Lee MK, Bok SH, Jeong TS, et al. Supplementation of naringenin and its synthetic derivative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats. *Bioorg Med Chem.* 2002; 10(7): 2239-44.

Archive of SID

The effect of the methanol extract of Caucasian whortleberry on glucose, oxidative biomarkers, cholesterol and HDL in diabetic male rats

Firouzeh M¹, Shahanipour K^{2*}

Received: 7/30/2015

Revised: 1/6/2016

Accepted: 1/20/2016

1. Dept of Biochemistry, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol. 13, No.4, Winter 2016

Par J Med Sci 2015;13(4):23-32

Abstract

Introduction:

Vaccinium arctostaphylos is a medicinal plant used for the treatment of diabetes. The present study was conducted to investigate the effect of the methanol extract of Caucasian whortleberry on glucose, oxidative biomarkers, HDL and cholesterol.

Materials and methods:

The present experimental study was conducted on 24 male Wistar rats divided into a healthy control group, a diabetic control group and two diabetic trial groups treated with 150 and 250 mg/kg of body weight doses of the methanol extract of Caucasian whortleberry. After inducing diabetes in the rats, the effect of 30 days of intraperitoneal injection of the extract was examined on their blood biochemical markers.

Results:

Comparing the two diabetic trial groups treated with Caucasian whortleberry extract revealed the 250 mg/kg dose to be the most effective concentration for reducing glucose, increasing HDL, increasing paraxonase activity, reducing malondialdehyde and reducing body weight, while the 150mg/kg dose of the extract was the most effective for reducing cholesterol and protein carbonyl ($P < 0.05$).

Conclusion:

The present study showed that the methanol extract of Caucasian whortleberry can reduce the adverse effects of diabetes on many biochemical markers and thus boasts medicinal properties.

Keywords: Glucose, Cholesterol, Malondialdehyde, Protein Carbonyl, Paraxonase

* Corresponding author, Email: shahanipur_k@yahoo.com