مقاله پژوهشی

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

نویسندگان:

مینا فیروزه[1]، کهین شاهانی پور[1]*

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 دوز های 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 دی آلدئید 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 ($P<۰/۰۵$).

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 دی آلدئید، پروتئین کربونیل، پاراکسوناز

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

مقدمه:

دیابت به‌عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مزمن و از علل اصلی مرگ‌ومیر در سراسر جهان شناخته‌شده 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 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

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

تلفن تماس: ۰۹۱۳۲۸۸۹۳۲۴ پست الکترونیک:shahanipur_k@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۴/۵/۸ اصلاح: ۱۳۹۴/۱۰/۱۶ پذیرش:۱۳۹۴/۱۰/۳۰

عوارض تأخیری دیابت داشته باشد [۷]. کربونیله 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 شناخته‌شده 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 بررسی‌شده 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 بیومولکول ها 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. بااین‌حال، تجویز منطقی گیاهان دارویی نیازمند داشتن اطلاعات دقیق از سازوکار عمل آن‌ها است [۱۴]. قره قاط یا سیاه گیله از جمله گیاهانی است که در طب سنتی برای آن اثر ضد دیابتی ذکرشده 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 استرپتوزتوسین است [۱۶-۱۷]. در مطالعات انجام‌شده روی انسان نیز اثر ضد دیابتی قره قاط تأییدشده است [۱۸]. سازوکارهایی که تاکنون برای نحوه پایین آوردن قند خون توسط قره قاط پیشنهادشده‌اند عبارت‌اند از: مهار جذب گلوکز از روده، افزایش برداشت گلوکز توسط سلول‌ها [۱۹] و مهار گلوکونئوژنز در کبد [۲۰]. آنتوسیانین ها از مهم‌ترین ترکیبات این گیاه هستند .بررسی‌های روی متابولیت های 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 رت های 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 بتاپانکراس 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 ایجادی درDNA سلولی است. آزمایش‌های اخیر نشان داده است که اصلی‌ترین دلیل تخریب و مرگ این سلول‌ها به سبب آلکیلاسیون DNA آن‌ها است [۲۴-۲۵]. ازآنجاکه انسولین در متابولیسم لیپیدها مؤثر است، این اختلال سبب افزایش میزان تری گلیسرید سرم می‌شود. با توجه به رابطه عکس غلظت TG باHDL ، کاهش مقادیر HDL و افزایش LDL در رت های 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 رت های 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

allivias از نژاد ویستار با وزن ابتدایی ۲۵۰–۲۰۰ گرم استفاده شد. ابتدا رت ها 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، رت های 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 رت ها آغاز و تا سی روز ادامه داشت. بعدازاین 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 اپندورف دو میلی‌لیتری مجزای Sample و Blank استفاده شد و بعد از رقیق‌سازی نمونه‌های سرم با سرم فیزیولوژی تزریقی به نسبت ۴:۱ به محتویات اپندورف، به هر کدام ۵۰۰ میکرو لیتر DNPH حل‌شده در HCL دو نرمال اضافه شد. به اپندورف Blank فقط ۵۰۰ میکرو لیتر HCL دو نرمال اضافه شد. اپندورف ها یک ساعت در تاریکی قرار داده شدند و در مرحله بعد به هر دو اپندورف تری کلرواستیک اسید TCA ۲۰ درصد سرد اضافه شد تا پروتئین‌ها رسوب دهند. سپس محتویات هر دو اپندورف 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 تشکیل‌شده در هر اپندورف در سه مرحله ترکیب اتانول/ اتیل استات اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸ تا ۱۰ درجه سلسیوس در ۸۰۰۰g سانتریفوژ شدند. محلول رویی فرایند سانتریفوژ دور ریخته شد. در پایان، سه مرحله به پلیت تشکیل‌شده گوانیدیوم هیدروکلراید شش مولار اضافه و با قرار دادن در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس، جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج 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 طول‌موج ۵۳۵ نانومتر استفاده شد [۳۱].

فعالیت ارگانوفسفات هیدرولازی یا همان پاراکسونازی آنزیم PON-1 با استفاده از محاسبه سرعت اولیه هیدرولیز سوبسترای پاراکسون به پارانیتروفنول تعیین می‌شود. به این منظور ابتدا بر اساس پروتکل Beltowski محلولی شامل ۱۰۰ میلی مولار از تریس هیدورکلریک اسید و ۲ میلی مولار کلسیم کلراید در غلظت نهایی ۲ میلی مولار پاراکسون تهیه و pH آن روی ۸ تنظیم می‌شود (مخلوط سنجش). درنهایت، با اضافه کردن ۲۰ میکرو لیتر از سرم حاوی آنزیم به این مخلوط در کووت (شرایط پایدار) میزان تشکیل P-nitro phenol در طول‌موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مونیتور 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= فعالیت آنزیم پاراکسوناز

F= (VT/VS)/ ε 412

VT= حجم کل (میکرو لیتر)، VS= حجم نمونه (میکرو لیتر)،

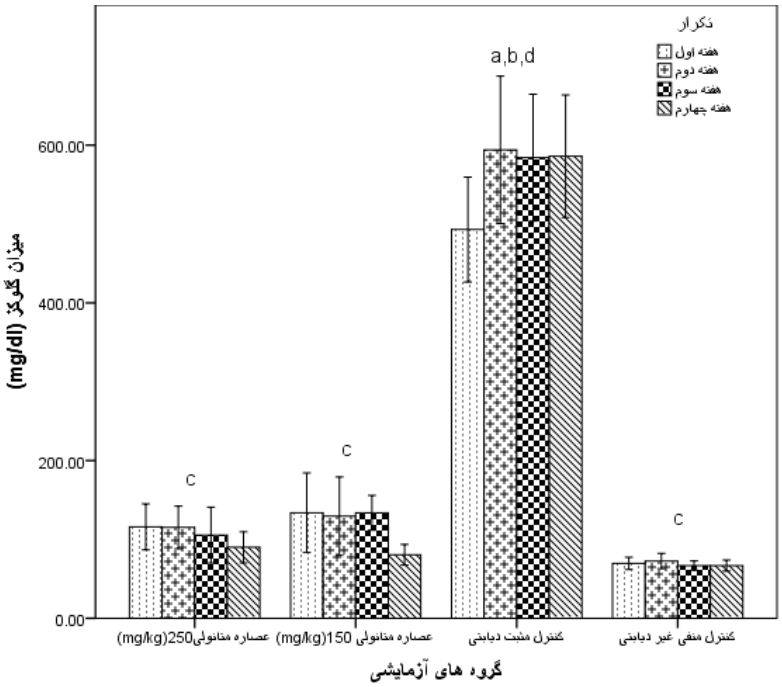
A = تغییر در جذب، T= زمان (دقیقه)

ε412 ضریب خاموشی مولار پاراکسوناز برمول در سانتی‌متر (۰/۰۱۸۲۹).

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.

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).



نمودار ۱: میانگین گلوکز سرم در گروه‌های موردمطالعه در چهار هفته متمادی

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار مقدار بیان‌شده 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 ۲۵۰mg/kg	تیمار با عصاره متانولی ۱۵۰ mg/kg	کنترل مثبت دیابتی	کنترل منفی غیر دیابتی
کلسترول(mg/dl)	^{d}۸۰/۸۳±۴/۷۱	۷۲/۰۰±۶/۵۷	۱۱۰/۰۰±۲۰/۲۷	^{a}۱/۸۲×۶۴/۶۰±
HDL (mg/dl)	^{b,c}۳/۶۷±۴۴/۶۷	^{a,c,d}۳۳/۱۷±۶/۵۲	^{a,b,d}۲۳/۸۰±۴/۲۱	^{b,c}۳/۷۶±۴۹/۱۷
پروتئین کربونیل (nmol/mg)	^{c,d}۵/۳۲±۱۸/۸۸	^{c,d}۱۵/۳۷±۳/۰۸	^{a,b,d}۳۲/۸۱±۶/۶۷	^{a,b,c}۵/۵۴±۳/۳۲
مالون دی آلدئید (µmol/dl)	^{c,d}۰/۷۶۳±۰/۰۸۴	^{c,d}۰/۸۳±۰/۰۲۵	^{a,b,d}۰/۹۳±۰/۰۷۸	^{a,b,c}۰/۲۳±۰/۰۲۶
پاراکسوناز(µu/l)	^{c}۱۶۵/۶۶±۲۰/۱۵	^{c,d}۱۵۰/۹۳±۱۰/۲۸	^{a,b,d}۹۸/۹۰±۱۲/۸۲	^{c,b}۱۷۰/۶۷±۱۷/۴۰

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار مقدار بیان‌شده است.

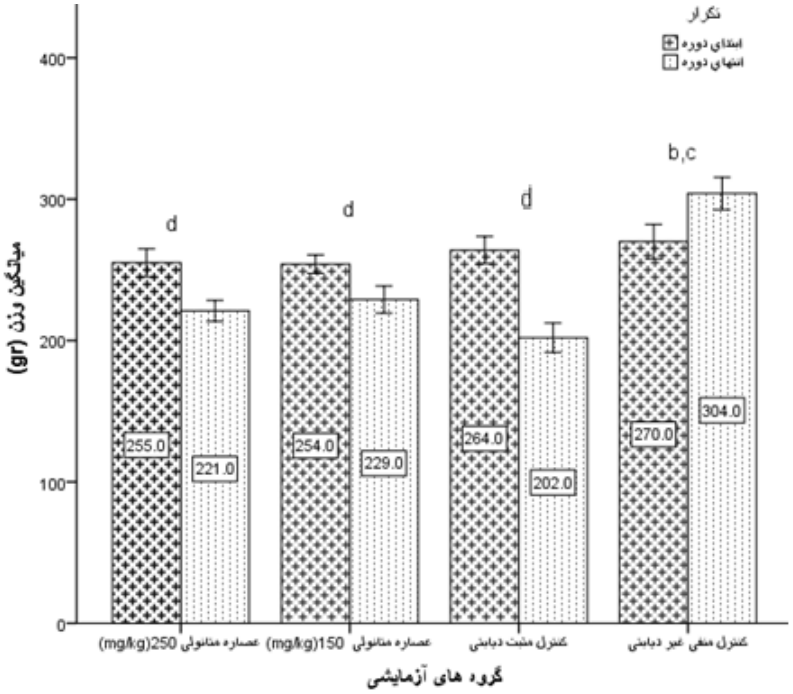
a: تفاوت آماری معنادار با گروه عصاره متانولی ۲۵۰ ؛ b: تفاوت آماری معنادار با گروه متانولی ۱۵۰

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،

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 <۰/۰۵). 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 معنادار 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 <۰/۰۵) (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 رت های 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 <۰/۰۵) (نمودار ۲).



نمودار ۲: میانگین وزن در گروه‌های موردمطالعه در ابتدا و انتهای دوره
نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار مقدار بیان‌شده 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:

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 تأییدشده 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 فلاونوئید ها 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 arctostaphylous را به‌احتمال‌زیاد 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 نیتروتیروزین و 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 گزارش‌شده 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 این‌رو 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 کوئرسین و ورزش هوازی، به‌طور قابل‌توجهی 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 فلاونوئیدکوئرسین 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 ایزوکوئرستین است [۴۰]، علت کاهش پروتئین کربونیل در گروه‌های تیمارشده با عصاره میوه قره قاط را می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و فلاونوئیدکوئرستین 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 [۴۲-۴۱]. کوئرستین از جمله فلاونوئیدهایی است که تأثیر مثبت آن بر فعالیت آنزیم PON 1 در حالت in vivo و in vitro گزارش‌شده است [۴۳]. تاکنون مطالعات گوناگون روی اثر میوه‌های مختلف که مخلوطی از فلاونوئیدها و ترکیبات مؤثر دیگر هستند بر فعالیت این آنزیم انجام‌شده 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 به سزایی داشته باشند. مطالعات محدودی خاصیت آنتی‌اکسیدانی برخی از فلاونوئید ها بر فعالیت آنزیم PON 1 را بررسی کرده‌اند [۴۵]. به نظرمی رسد وجود ترکیبات فنلاونوئیدی در گیاه قره قاط توانسته است میزان فعالیت سرمی آنزیم پاراکسوناز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهد که با مطالعات آویرام و

بویچ 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 رت های دیابتی شده با استرپتوزتوسین دارد. عصاره این میوه در کنترل دیابت و اختلال چربی‌ها نقش داشته و قادر است استرس اکسیداتیو را از طریق کاهش مالون دی آلدئید و پروتئین کربونیل و فعال‌سازی آنزیم پاراکسوناز کاهش دهد. با توجه به این‌که 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 نکرده اند

References:

1. Mohammadi Karizno F, Saghebjoo 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)
2. 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.
3. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Med Sci Monit. 2006; 12(7): RA130-47.
4. 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)
5. Torros MD, Canal JR, Perez C. Oxidative stress in normal and diabetic rats. Physiol. Res 1999; 8:203-208.
6. Sandra RA, Rauscher FM, Watkins JB. Effect of quercitin on antioxidant defense in streptozotocin- Induced diabetic rats. J Biochem.Molec Toxicol 2001;5:143-149.
7. 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.
8. 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.
9. Precourt LP, Amre D, Denis MC, et al. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. Atherosclerosis. 2011;214:20-36.
10. Azizi F, Raiszadeh F, Solati SM. Serum lipids, lipoproteins and apoliproteins and paraoxonase enzyme activity in patients with thyroid dysfunction. Iran J Endocrindogy & Metab2001;3:11-22. (Persian)
11. Pasaoglu H,Sancak B,Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type2 diabetes mellitus.Tohoku J Exp Med 2004; 203:211-218.
12. Jetawattana S. Malondialdehyde(MDA),a lipid oxidation product. Free Radicals in Biology and Medicine The University of Iowa 2005;72(222):1-11.
13. 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.
14. Shafiee-Nick R, Parizadeh SMR, Karimi A. Evaluation of the effect of aqueous-alcohlic 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.komesh 2011;12:4(40). (Persian).
16. Roghani M, Balouchnejad Mojarad T, Taheri S. Effect of oral consumption of areal parts of Vaccinium myrtilluson 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-adrenceptids to increase glucose uptake in to cultured C1C2 cells, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol,2000; 362(2)122-7.
20. Arion W J., Canfield W K, Ramos FC, et al. Chlorogenic asid 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 Diab2008;26(1): 8-13.
23. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b 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,Inous 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 Oidative Stress in Adult P atients with H yperlipidemia :A Randomized, Double- Blind, Placebo – Controlled Clinical trial, Evidence – Based Complentary and Alternative Medicine (eCAM)J. Hindawi Publishing Corporation 2014; Article ID 217451, 6 Pages.
36. Mohammadi Karizno F, Saghebjoo 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. SuzukiYJ,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. Eveluation 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

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 deri vative alters antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats. Bioorg Med Chem. 2002; 10(7): 2239-44.

hypercholesterolemic rabbits. J Med Plants 2007;7:93-104.
41. Azizi F, Rahmani M, Raiszadeh F,et al. Association of lipids lipoproteins, apolipoproteins and paraoxanse 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 paraoxon ase 1 activity--studies in cultured cells, mice and

Original Article

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

Firouzeh M[1], Shahanipour K[2*]

Received:7/30/2015 Revised:1/6/2016 Accepted: 1/20/2016

1.Dept of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, , 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, Paraoxonase

* Corresponding author, Email: shahanipur_k@yahoo.com