زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره اول، پاییز ۱۴۰۰، صفحات ۲۰۸- ۱۹۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر ساپونین و بتا-کاروتن به عنوان ترکیبات شاخص در گیاهان دارویی بر روی عوارض دیابت القا شده با آلوکسان در مدل حیوانی رت

آرزو معرفت، لیلا صادقی*

گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

*مسئول مکاتبات: l.sadeghi@tabrizu.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2021.684789

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۹

چکیده

دیابت شیرین یک بیماری متابولیک مزمن است که با افزایش قند خون و نیز برخی ناهنجاری‌ها در بافت پانکراس و کبد همراه است. مطالعات نشان داده است برخی از مواد شیمیایی مانند آلوکسان و استرپتوزوتوسین از طریق آسیب به بافت پانکراس آزادسازی انسولین را مختل کرده و علائمی مانند دیابت از جمله افزایش قند و چربی خون ، التهاب ، استرس اکسیداتیو را در حیوانات ایجاد می کنند. لذا به نظر می‌رسد ترکیبات طبیعی که به طور سنتی به عنوان آنتی اکسیدان یا ضد چاقی استفاده می‌شدند، بتوانند خاصیت ضد دیابت نیز داشته باشند. در این مطالعه ویژگی ضد دیابتی ترکیبات طبیعی ساپونین و بتا-کاروتن بر روی موش‌های دیابتی (ناشی از مصرف آلوکسان) که دارای علایم بیوشیمیایی، التهابی و بافتی می‌باشند بررسی شد. اندازه‌گیری فاکتورهای خونی و التهابی نشان داد تزریق آلوکسان باعث افزایش قند و چربی خون می‌شود که با علائم التهابی و استرس اکسایشی همراه است. به طور کلی تیمار با ترکیبات گیاهی التهاب ناشی از استرس اکسیداتیو در موش‌های دریافت کننده آلوکسان را بهبود بخشید و همچنین با بهبود جزایر لانگرهانس باعث کاهش ناهنجاری در بافت پانکراس شد و به این ترتیب باعث ترشح منظم و طبیعی انسولین گردید. ترشح انسولین باعث تحریک جذب گلوکز و لیپیدها شده و همچنین باعث بهبود پروفایل لیپوپروتئین‌ها در موش‌های دیابتی می‌شود. با در نظر گرفتن نتایج حاصل و شباهت بین دیابت ناشی از آلوکسان در موش‌های صحرایی و بیماران دیابتی، از ساپونین و بتا-کاروتن یا ترکیبات شیمیایی مشابه می‌توان در کاهش خطر ابتلا به دیابت و همچنین درمان بیمارانی که از دیابت یا سایر اختلالات متابولیکی رنج می‌برند استفاده کرد.

کلمات کلیدی: دیابت شیرین، افزایش قند خون، افزایش چربی خون، جزایر لانگرهانس، ویژگی آنتی اکسیدانی.

مقدمه

زندگی انسان‌ها به شمار می‌رود (۲۹). علامت اصلی این بیماری افزایش گلوکز خون است اما بیماران دیابتی از اختلالات ثانویه دیگری از جمله اختلال در متابولیسم

بیماری دیابت یک اختلال متابولیک مزمن است که بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO) در سال‌های اخیر یکی از مهمترین عوامل تهدید کننده

گزارش‌های منتشر شده این ماده در کاهش خطرات قلبی-عروقی موثر است (۱۵).

ساپونین به علت پتانسیل احیاء منفی یک آنتی اکسیدان قوی محسوب می‌شود و در گیاهان به منظور دفاع در برابر استرسهای محیطی و نیز عوامل بیماری زا تولید می‌شود (۲٤،۸). ساپونین با تاثیر بر مسیر پیام رسانی التهاب باعث بهبود مقاومت به انسولین در مدل‌های حیوانی چاقی می‌شود (۲٦).

کارتنوئیدها ترکیبات تتراترپنوئیدی قوی هستند که در گیاهان، جلبک‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند و دو نقش مهم دارند: جذب نور برای فتوسنتز و محافظت از کلروفیل در برابر اکسیداسیون نوری (۱۲). برخی از کاروتنوئیدها از جمله بتا-کاروتن نقش ضد سرطانی دارند و نیز تحریک کننده ترشح انسولین هستند (۱۲، ۱۵).

در برخی مطالعات مشاهده شده بتا-کاروتن مقاومت به انسولین را در بیماران دیابتی کاهش می‌دهد (۱٤).

تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثربخشی قطعی ساپونین و بتا-کاروتن خالص بر روی بیماران دیابتی یا مدل‌های حیوانی دیابت با شواهد تجربی معتبر گزارش نشده است. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثر بتا-کاروتن و ساپونین در بهبود علائم بیوشیمیایی و بافت شناسی رت‌های دیابتی، القا شده با آلوکسان، و نیز مقایسه اثر این دو ماده طبیعی می‌باشد. مدل دیابت القا شده با آلوکسان یکی از مدل‌های حیوانی مفید برای مطالعات آزمایشگاهی می‌باشد. مکانیسم دقیق چگونگی اثر آلوکسان هنوز مشخص نیست اما مطالعات نشان داده است که آلوکسان با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به طور انتخابی سلول‌های بتا را در بافت پانکراس تخریب می‌کند و تولید انسولین را به شدت کاهش می‌دهد در چربی‌ها، عدم تنظیم مقدار مناسب لیپوپروتئین‌ها در بدن، چاقی، اختلالات عصبی متعدد، نقص در سیستم آنتی اکسیدانی بدن و ... نیز رنج می‌برند (۳۰). در بیماری دیابت نوع I غلظت انسولین در خون به علت تخریب سلول‌های بتا در جزایر لانگرهانس که تولید کننده این هورمون هستند کاهش می‌یابد لذا درمان مناسب برای این نوع بیماری استفاده از انسولین تزریقی می‌باشد که در برخی از بیماران می‌تواند باعث کنترل مقدار قند خون شود (۲۷،۲۰).

داروهای دیگری نیز جهت کنترل قند خون استفاده می-شود ولی این ترکیبات دارای عوارض نامطلوب متعددی بوده و در دراز مدت بر روند ایجاد عوارض ناتوان کننده دیابت تاثیر ندارند (۷). در سالهای اخیر مصرف داروهای گیاهی جهت کنترل قند خون افزایش یافته است ضمن اینکه در بیشتر موارد مصرف این گیاهان باعث کنترل عوارض ثانویه ناشی از دیابت نیز می‌شوند (۷). اکثر گیاهان موثر دارای ویژگی آنتی اکسیدانی هستند و در صورت استفاده طولانی مدت می‌توانند روی غلظت گلوکز و لیپیدها در خون اثر داشته باشند (۷).

در بین گیاهان دارویی متعددی که بر روی دیابت اثرات مفیدی دارند حضور دو ماده بتا-کاروتن و ساپونین به صورت مشترک قابل توجه هست (۸).

بر اساس ویژگی‌های ساختاری نیز به نظر می‌رسد این دو ماده بتوانند برای بهبود علائم دیابت به ویژه آسیب اکسایشی مفید باشند.

ساپونین‌ها ترکیبات طبیعی هستند که از یک بخش استروئیدی یا تری‌ترپنوئیدی تشکیل شده‌اند که با پیوند کوالان به یک بخش قندی متصل است (۸). براساس

تیمار با دوز mg/kg ۱۲۰ آلوکسان به صورت داخل صفاقی که باعث ایجاد وضعیت دیابتی در رت‌ها می‌شود (۲۱). گروه سوم: رت‌های دیابتی که دوز mg/kg ۵۰ از ساپونین حل شده در نرمال سالین را روزانه به مدت ۱۵ روز دریافت کردند. گروه چهارم: رت‌های دیابتی که دوز mg/kg ۵۰ از بتا-کاروتن حل شده در نرمال سالین را روزانه و به مدت ۱۵ روز دریافت کردند. با توجه به اینکه مطالعات پیشین عدم تاثیر قابل توجه بتا-کاروتن و ساپونین را در سلامت رت‌ها گزارش کرده بودند، به جهت صرفه جویی در مصرف حیوان، گروه کنترل دریافت کننده بتا-کاروتن (۳ رت) و ساپونین (۳ رت) با رت‌های دریافت کننده سالین (۳ رت) ادغام شد و گروه کنترل شامل ۹ رت می‌باشد.

برای دیابتی کردن رت‌ها به هر حیوان یک دوز mg/kg ۱۲۰ آلوکسان به صورت داخل صفاقی تزریق شد. هفت روز پس از تزریق مقدار گلوکز خون رت‌ها اندازه گیری شد و موش‌هایی با غلظت قند خون بالای cc ۲۰۰ mg/۱۰۰ به عنوان مدل دیابتی در نظر گرفته شدند. در ادامه موش‌های دیابتی با محلول بتا-کاروتن و ساپونین به روش غذادهی با لوله تیمار شدند.

اندازه گیری غلظت گلوکز خون: تشخیص کمی غلظت گلوکز در سرم خون رت‌های کنترل و تیمار شده با روش رنج سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (طیف سنج نوری) و کیت شرکت پارس آزمون انجام شد. در این روش آنزیمی غلظت گلوکز بر اساس رنگ صورتی تولید شده در طول موج ٥٤٦ نانومتر و بر اساس روش پیشنهادی شرکت تولید کننده کیت سنجش می‌شود و با استفاده از منحنی نتیجه باعث افزایش گلوکز خون و افزایش سطح کلسترول، تری‌گلیسیرید، LDL، VLDL سرم و کاهش سطح HDL می‌شود که عوارض ثانویه ناشی از کمبود انسولین در موش‌های صحرایی است (۵) و به همین دلیل مدل مناسبی برای مطالعات در حوزه دیابت محسوب می‌شود. در این مطالعه پروفایل لیپوپروتئین‌ها و سطح چربی‌ها در رت‌های دیابتی و تیمار شده بررسی شد. ضمن اینکه تاثیر دو ماده طبیعی بر روی آسیب‌های اکسایشی و التهاب در رت‌های دیابتی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: مواد ساپونین و بتا-کاروتن با خلوص بالای ۹۵ درصد، دی کلروفلوروسین دی استات (DCFHDA)، فلاوین و نیتروبلو تترازولیوم از شرکت سیگما خریداری شد. هیدروژن پراکسید محصول شرکت مرک آلمان تهیه شد و سایر مواد و حلال‌ها نیز در بالاترین کیفیت در دسترس استفاده شدند.

حیوانات آزمایشگاهی: رت‌های سفید آزمایشگاهی از نژاد ویستار با وزنی حدود ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از حیوان خانه انیستیتوپاستور تهران خریداری شدند. تمام حیوانات در قفس‌های مخصوص در حیوان خانه در دمای ۲۵ درجه و تکرار زمان روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته به مدت ۲ هفته نگهداری شدند تا با شرایط محیطی سازگاری پیدا کنند. در طول این مدت رت‌ها با غذای آماده و آب شهری تغذیه شدند. در این مطالعه حدود ۳۳ حیوان استفاده شد که به صورت تصادفی در ۳ گروه ۸ تایی و یک گروه ۹ تایی قرار گرفت. گروه اول: گروه کنترل که با تزریق سالین به منظور همسان سازی شوک حاصل از تزریق تیمار شد. گروه دوم:

فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز در هموژنایز بافت پانکراس رت‌های تیمار شده و کنترل بر اساس روش Aebi و همکاران اندازه گیری شد (۱). در این روش پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترا برای آنزیم کاتالاز استفاده می‌شود. کاهش مقدار سوبسترا در حضور آنزیم به صورت کاهش جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر در مدت زمان یک دقیقه اندازه گیری می‌شود.

وسترن بلات: به منظور بررسی التهاب در بافت پانکراس، سطح پروتئین‌های فاکتور نکروزی توموری آلفا (TNF-α) و اینترلوکین ۱-بتا (IL-1β) به عنوان بیومارکرهای اصلی در فرایند التهاب با روش وسترن بلاتینگ اندازه‌گیری شدند (۲۰). برای این سنجش بافت پانکراس در بافر فسفات هموژنیزه شد و محتوای پروتئوم آن استخراج گردید. مقدار مشخصی از پروتئین‌های هر نمونه پس از تعیین غلظت توسط الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید (SDS-PAGE) از همدیگر جدا شدند و سپس باند حاوی پروتئین مورد نظر توسط آنتی بادی اختصاصی بر روی کاغذ PVDF سنجیده شد (۳۱). آنتی بادی اختصاصی علیه TNF-α (ab9755) و IL-1β (ab9787) از شرکت Abcam خریداری شد و در هنگام استفاده با نسبت ۱:۱۰۰۰ رقیق شد. به منظور آشکارسازی باند حاوی پروتئین مورد نظر از کیت ECL و بر اساس دستورالعمل مربوطه استفاده شد. آنتی بادی علیه پروتئین بتا-اکتین به منظور کنترل غلظت پروتئین در چاهک‌های ژل استفاده شد. بعد از آشکارسازی، چگالی هر باند توسط نرم افزار Image J سنجیده و با گروه کنترل مقایسه شد.

مطالعات بافتی: جهت بررسی سلامت و ظاهر بافت پانکراس در رت‌های تیمار شده، بعد از انجام آزمایشات کالیبراسیون کمی می‌شود. همه سنجش‌ها در این مطالعه حداقل سه بار تکرار شده است.

اندازه گیری استرس اکسایشی در خون رت‌های مورد آزمایش: اندازه‌گیری رادیکال آزاد اکسیژن: محتوای رادیکال آزاد اکسیژن موجود در بافت پانکراس هموژنیزه شده رت‌های دیابتی و تیمار شده بر اساس یک روش استاندارد اندازه گیری شد. در این روش تبدیل DCFHDA احیا به دی‌کلروفلوروسین اکسید (DCFH) در حضور مقادیر مشخصی از عصاره بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷). از روی مقدار معرف اکسید شده می‌توان مقدار رادیکال آزاد اکسیژن یا ROS را در بافت پانکراس رت‌ها با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه کرد.

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیس موتاز (SOD): فعالیت این آنزیم با استفاده از روش ریبوفلاوین/ نیتروبلوتترازولیوم (NBT/RF) محاسبه شد. اساس این روش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم توسط سوپراکسید دیس موتاز است (۲۳). مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی مولار پتاسیم فسفات (pH ۷/۸)، ۱۳ میلی مولار متیونین، ۰/۱ میلی مولار اتیلن‌دی‌آمین ترا استیک اسید، ۷۵ میلی مولار نیتروبلوتترازولیوم و ۳۰ میکرولیتر عصاره بافتی بوده و حجم نهایی آن ۳ میلی-لیتر بوده است. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه زیر لامپ فلورسنت ۱۵ واتی و در فاصله ۳۵ سانتی‌متری قرار گرفت و تولید یون با نور تشدید شد. مقدار یون تولید شده توسط جذب نوری در ۵۶۰ نانومتر محاسبه شد. مقدار آنزیم موجود در نمونه که بتواند تولید یون سوپر اکسید را ۵۰٪ مهار کند به عنوان واحد فعالیت آنزیمی SOD در نظر گرفته شد.

n = ۸) و به مقدار داده‌های کنترل نزدیکتر می شود (جدول ۱) که نشان از وضعیت مطلوب آن‌هاست لذا در ادامه فاکتورهای خونی و سطح سیتوکین‌ها نیز سنجیده شد.

نتایج نشان می‌دهد تزریق دوز حاد آلوکسان باعث افزایش معنی‌دار غلظت گلوکز خون در رت‌ها می‌شود (* $p < ۰/۰۵$، n = ۸). ضمن اینکه در رت‌های کنترل که سالین، بتا-کاروتن یا ساپونین در دوز بالا را دریافت کرده‌اند، تغییر معنی‌داری در غلظت گلوکز مشاهده نمی‌شود ($p> ۰/۰۵$ ، n=۸). رت‌های دیابتی تیمار شده با بتا-کاروتن و ساپونین نشان دهنده اثر مثبت این ترکیبات گیاهی بر روی غلظت گلوکز خون در مقایسه با رت‌های گروه دیابتی می‌باشد (# $p <۰/۰۵$، n = ۸). جدول ۲ نشان دهنده اثر کاهنده گلوکز خون برای ساپونین و بتا-کاروتن در موش‌های دیابتی است.

در این مطالعه پروفایل لیپیدها نیز در گروه‌های مختلف بررسی شده است و نتایج نشان می‌دهد تزریق آلوکسان علاوه بر گلوکز مقدار تری‌گلیسیرید و کلسترول خون را نیز به طور قابل توجهی نسبت به کنترل افزایش می‌دهد (* $p <۰/۰۵$ ، n = ۸). اما تیمار رت‌های دیابتی با ساپوین و بتا-کاروتن سطح تری‌گلیسیرید و کلسترول را تا نزدیکی داده‌های کنترل کاهش می‌دهد (# $p <۰/۰۵$، n = ۸). به نظر می‌رسد ساپونین تاثیر بیشتری بر روی کاهش سطح کلسترول خون داشته است.

نسبت لیپوپروتئین‌های خون در اثر تزریق آلوکسان تغییر یافته و مقدار لیپوپروتیین با چگالی بالا (HDL) در حیوانات دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش در حالی که لیپوپروتئین با چگالی پایین (VLDL) افزایش قابل توجهی یافته است (* $p < ۰/۰۵$، n = ۸) که از این نظر رت‌ها بیهوش شدند و بافت پانکراس خارج گردید و جهت تثبیت بافت خارج شده از بافرفسفات و فرمالین ۱۰٪ استفاده گردید و از بافت تثبیت شده برش‌هایی انجام گرفت. مقاطع حاصل با روش هماتوکسیلین-ائوزین و بر اساس روش استاندارد (۱۰) رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

مطالعات آماری: در این مطالعه همه نتایج کمی به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SEM) حاصل از تکرارهای زیستی گزارش شده است. داده‌ها در هر گروه با روش آنوای یک طرفه در نرم افزار SPSS بررسی و با گروه کنترل مقایسه شد. در نتیجه در هر مقایسه $p <۰/۰۵$ به عنوان آستانه تفاوت معنی‌داری در نظر گرفته شد و داده هایی که با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشته‌اند با علامت * مشخص شدند. مقایسه گروه‌های تیمار شده با گروه دیابتی نیز انجام شده و داده‌های دارای تفاوت معنی‌دار ($p <۰/۰۵$) با علامت # مشخص شدند.

نتایج

در این مطالعه رت‌های بالغ با تزریق دوز بالای آلوکسان دیابتی شدند که مقدار مصرف آب و غذا توسط آنها به طور معنی‌داری افزایش یافت (۲۱). پس از تائید شرایط دیابتی در رت‌ها، تیمار با مواد گیاهی به مدت ۱۵ روز انجام شد. در طول مدت تیمار مقدار آب و غذای مصرف شده توسط رت‌ها مورد بررسی قرار گرفت که نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد مقدار مصرف غذا و آب توسط رت‌های دیابتی به طور معنی‌داری بالاتر از مقدار کنترل است (* $p <۰/۰۵$، n=۸) . اما در اثر تیمار با ترکیبات گیاهی مصرف آب و غذا کاهش قابل توجهی را نسبت به رت‌های دیابتی نشان می دهد (# $p <۰/۰۵$،

آنزیم CAT در رت‌های دیابتی دریافت کننده دوز حاد آلوکسان در مقایسه با گروه کنترل است (* ۰/۰۵ > p، ۸ = n).

مصرف بتا-کاروتن فعالیت SOD را تا نزدیکی داده‌های رت‌های کنترل بالا برد اما فعالیت SOD در این گروه با گروه کنترل و دیابتی تفاوت معنی‌داری دارد (# ۰/۰۵> p، ۸ = n). تیمار با ساپونین و بتا-کاروتن فعالیت آنزیم SOD را به ترتیب ۲ و ۱/۷ برابر افزایش می‌دهد (# ۰/۰۵> p، ۸ = n). در حالی که فعالیت آنزیم کاتالاز که در رت‌های دیابتی دارای افزایش فعالیت بود، به واسطه تیمار با ساپونین و بتا- کاروتن به ترتیب ۱/٤ و ۱/٦ برابر کاهش یافت و به نزدیکی رت‌های کنترل رسید اما هنوز فعالیت کاتالاز در هر دو گروه دریافت کننده ترکیبات گیاهی با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارد (*# ۰/۰۵> p، ۸ = n).

یکی از مهمترین ویژگی‌های سندرم‌های متابولیکی به ویژه دیابت، التهاب است. براساس مطالعات پیشین افزایش سطح سیتوکین‌ها یکی از عوامل تشدید التهاب در بیماران دیابتی می‌باشد (۱٦، ۲۲). لذا به منظور تخمین شرایط التهابی در بافت پانکراس سطح سیتوکین‌های IL-1β و TNF-α با روش آنالیز وسترن سنجیده شد (شکل ۲). براساس شکل ۲ غلظت هر دو سیتوکین در موش‌های دیابتی افزایش معنی‌داری نشان داده است (* ۰/۰۵> p، n=۸) که تائیدکننده التهاب حاد در پانکراس موش‌های تیمار شده با آلوکسان می‌باشد. غلظت TNF-α حدود ۲ برابر و IL-1β حدود ۱/۷ برابر نسبت به رت‌های کنترل زیاد شده بود. همچنین در شکل کاهش معنی‌دار هر دو سیتوکین را در اثر تیمار ۱۵ روزه با بتا- کاروتن در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده می‌کنیم (# ۰/۰۵> p، ۸ = n). تیمار با ساپونین نیز داده‌های مدل مورد مطالعه که آلوکسان دریافت کرده است شبیه به بیماران دیابتی می‌باشد (۱۵).

تیمار با ۵۰ mg/kg ساپونین مقدار HDL را در خون رت‌های دیابتی به صورت قابل توجه افزایش می‌دهد (# P<۰/۰۵، n=۸). بتا-کاروتن نیز تا حدی سبب افزایش HDL در خون رت‌های دیابتی می‌شود ولی این تغییر از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (n=۸، P<۰/۰۵). در حالی که کاهش VLDL و LDL در سرم خون رت‌های دیابتی دریافت کننده ساپونین و بتا-کاروتن در مقایسه با حیوانات دیابتی دریافت کننده سالین معنی‌دار است (# ۰/۰۵> p، ۸ = n).

براساس مطالعات پیشین استرس اکسایشی تاثیر زیادی بر روی شروع و توسعه بیماری دیابت و عوارض ناشی از آن دارد (۱٤). لذا اندازه گیری مقدار رادیکال آزاد اکسیژن (ROS) در بافت پانکراس یک دید کلی در مورد وضعیت اکسایش بافت هدف در اختیار ما قرار می‌دهد. نتایج نشان دهنده افزایش بیش از حد ROS در بافت پانکراس رت‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل (* ۰/۰۵ > p، ۸ = n) است ولی تیمار با ساپونین سبب کاهش فلورسانس DCF از ۲۰/۱۳ ± ۵۹۷/۷۳ به ۱٦/۱۰ ± ۲٦۳/۷۲ در رت‌های دیابتی می‌شود که نشان از کاهش معنی‌دار رادیکال‌های آزاد اکسیژن دارد (# ۰/۰۵> p، n=۸). تیمار با بتا-کاروتن نیز باعث کاهش فلورسانس تا ۱۵/۲٤ ± ۲۵۰/۳٦ می‌شود که بسیار نزدیک داده‌های رت‌های کنترل (۱٦/۱۰ ± ۲۱۰/۳٦) است ولی تفاوت معنی‌داری با رت‌های دیابتی دارد (# ۰/۰۵> p، ۸ = n) (٤).

فعالیت دو آنزیم آنتی اکسیدان SOD و CAT نیز در بافت پانکراس اندازه گیری شد (شکل ۱). نتایج تائید-کننده کاهش فعالیت آنزیم SOD و افزایش فعالیت

است اندازه جزایر لانگرهانس نیز در اثر آسیب با آلوکسان کاهش یافته است. سلولهای نکروتیک با هسته‌های چروک شده (pyknotic) که با پیکان در شکل مشخص است نشان دهنده تخریب سلولهای تولید کننده انسولین در جزایر لانگرهانس می‌باشد (۱۸).

مقدار آسیب‌های ذکر شده در رت‌های دیابتی در اثر تیمار ۱۵ روزه با ساپونین و بتا-کاروتن تا حدی بهبود یافته است ولی هنوز می‌توان نواحی آسیب دیده را شناسایی کرد. در حالی که بافت مربوط به رت‌های کنترل دریافت کننده آب، ساپونین و بتا-کاروتن کاملا طبیعی و بدون هیچ اثر مخربی بر روی بافت پانکراس است، به نظر می‌رسد ساپونین اندکی نسبت به بتا-کاروتن دارای اثر بهبودی بیشتری است.

نیز هر دو سیتوکین را در رت‌های دیابتی کاهش می‌دهد (# $n = ۸، p <$ ۰/۰۵) حتی می تواند سطح TNF-α را تا اندازه‌ای کاهش دهد که تفاوت معنی‌داری با داده‌های کنترل نداشته باشد ($n=۸، p >$ ۰/۰۵). با توجه به نتایج حاصل و به منظور بررسی تاثیر شرایط غیرعادی القا شده توسط آلوکسان بر روی بافت پانکراس در موش‌های دیابتی و تیمار شده در بخش بعد مطالعه مقاطع بافتی و مقایسه آن‌ها با کنترل انجام شد.

در شکل۳ تصویر مقاطع بافتی مربوط به پانکراس در رت‌های دیابتی، کنترل و تیمار شده با ترکیبات گیاهی مشاهده می‌شود. مقاطع بافتی در رت‌های دیابتی نشان دهنده‌ی آسیب دیدگی با مرزهای نامشخص در جزایر لانگرهانس می‌باشد که نشان دهنده تخریب آنها در اثر تزریق آلوکسان است. همانطور که در شکل مشخص

جدول ۱- میزان مصرف آب و غذا توسط رت‌های چهار گروه در طول آزمایش.

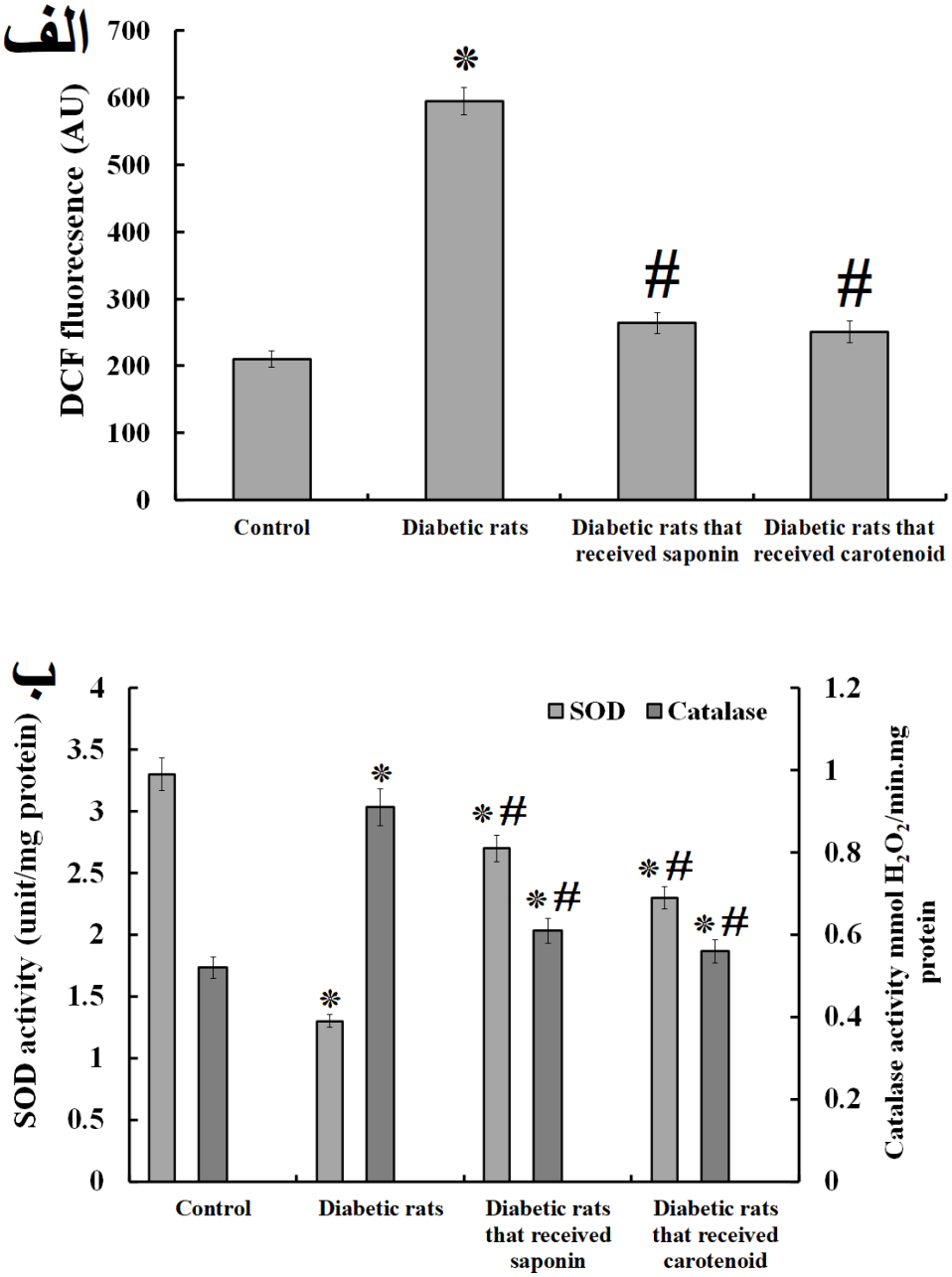
گروه‌ها	جذب غذا (g)	جذب آب(ml)
کنترل	۲۰/۵ ± ٤/٥	٥٤/٣ ± ٨/٤
گروه دیابتی (تیمار شده با آلوکسان)	* ٣٦/٢±٥/٧	* ١٤٦/٤±٢١/٦
رت‌های دیابتی تیمار شده با ساپونین	# ٢٤/٥±٥/٢	#* ٨٠/٢±١٦/٤
رت‌های دیابتی تیمار شده با بتا-کاروتن	* ٣٤/٢±٤/١	* ١٣١/٣±١٩/٣

هر داده نشانگر SED ± میانگین است و نمادهای * تغییرات معنی‌دار را با $p <$ ۰/۰۵ نسبت به کنترل و نمادهای # تفاوت معنی‌دار را نسبت به گروه دیابتی نشان می‌دهد.

جدول ۲- محتوای گلوکز، لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها در سرم خون رت‌های کنترل و تیمار شده.

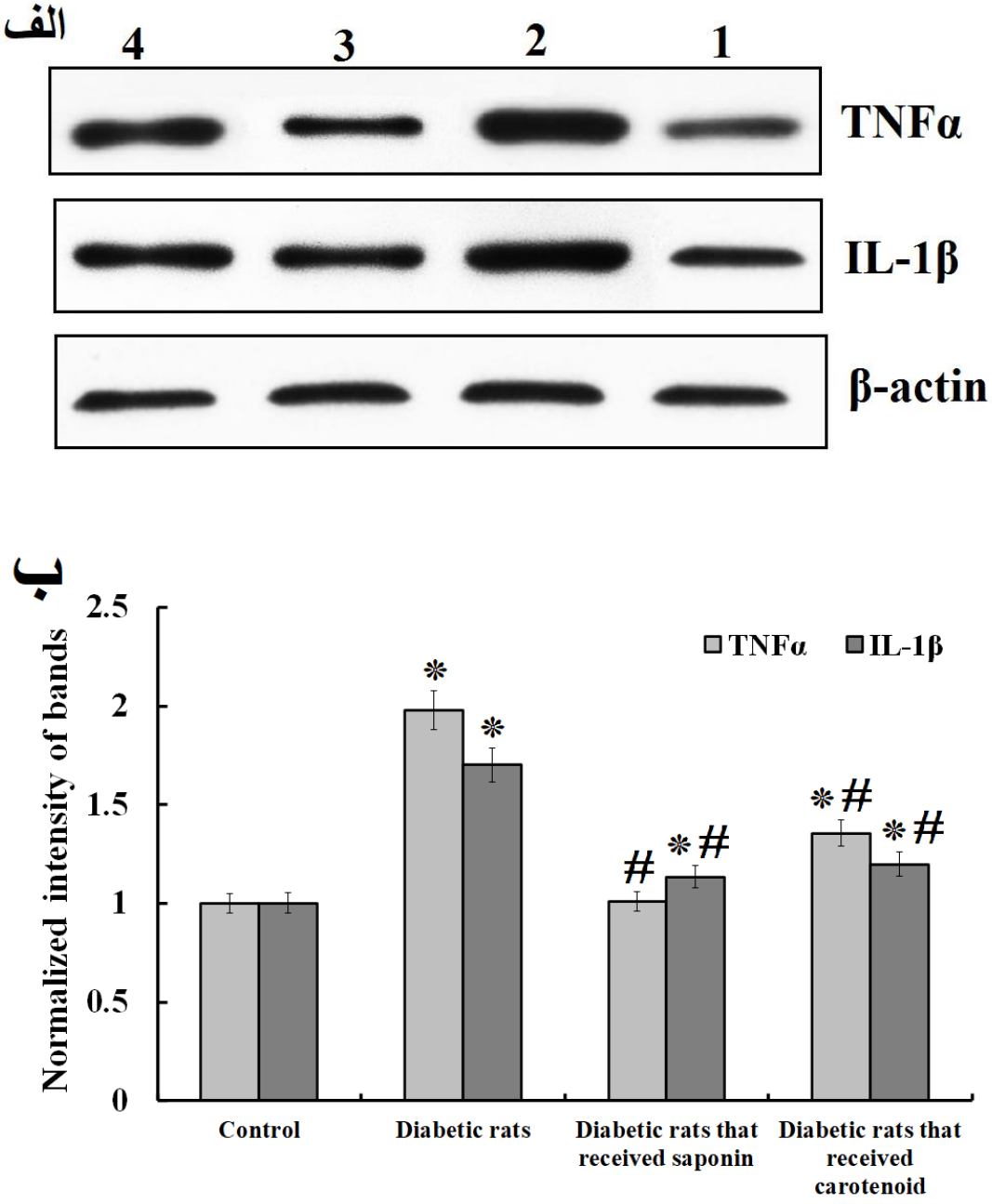
فاکتورهای اندازه‌گیری شده	کنترل	گروه‌های دیابتی	تیمار با ساپونین	تیمار با بتا-کاروتن
گلوکز (۱۰۰۰ mg/cc)	۱۰۰/۹ ± ۸/۱	* ۲٥۸/۲ ± ١٦/٢	#* ١٣٨/٥ ± ١٤/٣	# ١١٨/٥±١٣/٠٧
تری‌گلیسرید (۱۰۰۰ mg/cc)	۹۲/۹ ± ٦/٦	* ٢٢٤/٨ ± ١٢/٧	# ١٠٤/٥±١١/٣	# ١٠٨/٨±٨/٤
کلسترول (۱۰۰۰ mg/cc)	٧٠/٣±٥/١	* ١١٣/١±١٠/٦	# ٨٠/١±٤/١	#* ٩٠/٢±٤/٣
HDL (۱۰۰۰ mg/cc)	١٨/١ ± ٣/٢	* ١١/٧±٣/٣	# ١٥/٣±٩/٢	# ١٣/٧٥±٤/٢٦
LDL(۱۰۰۰ mg/cc)	١٢/٤ ± ٣/٢	* ٢٠/٩± ٤/٢	١٧/٣±٣/٥	#١٥/٧±٤/٩
VLDL (۱۰۰۰ mg/cc)	٣٨/٢±٨/١	* ٨٢/٥±٩/١	# ٣٩/٤±١٠/١	# ٤٣/٣±٩/٦

هر داده نشانگر SED ± میانگین است و نمادهای * تغییرات معنی‌دار را با $p <$ ۰/۰۵ نسبت به کنترل و نمادهای # تفاوت معنی‌دار را نسبت به گروه دیابتی نشان می‌دهد.



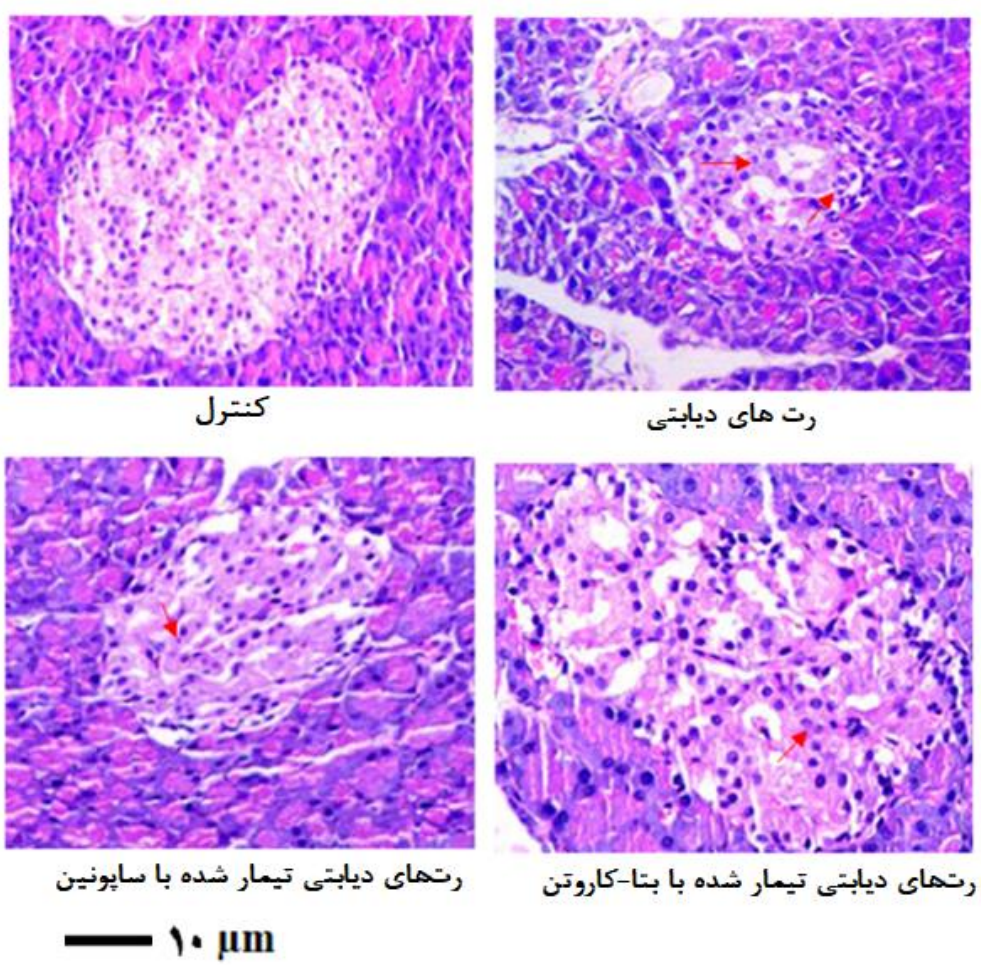
شکل ۱- مقایسه‌ی استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی، تیمار شده و کنترل. الف: افزایش فلورسانس DCF در موش‌های دریافت کننده آلوکسان به تولید بیش از حد ROS اشاره دارد که بطور قابل توجهی توسط کاروتنوئید و ساپونین کاهش می‌یابد. ب: فعالیت

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در گروه‌های آزمایشی نشان دهنده کاهش فعالیت SOD و افزایش فعالیت CAT در موش‌های دیابتی است. افزایش ذکر شده توسط بتا-کاروتن و ساپونین بهبود می‌یابد. هر داده نشانگر S.E.D±میانگین است و نمادهای * تغییرات معنی‌دار را با P<۰/۰۵ نسبت به کنترل و نمادهای # تفاوت معنی‌دار را نسبت به گروه دیابتی نشان می‌دهد.



شکل ۲- اندازه گیری سیتوکین‌ها با وسترن بلات. بیان TNF-α و IL1-β که به شرایط التهابی اشاره دارند، در موش‌هایی که آلوکسان دریافت کرده‌اند افزایش می‌یابد. تیمار موش‌های دیابتی توسط ساپونین و بتا-کاروتن به طور قابل توجهی بیان سیتوکین‌ها را در بافت

پانکراس کاهش داد. ستون ۱ مربوط به کنترل، ستون ۲ مربوط به موش‌های دیابتی، ستون ۳ مربوط به موش دیابتی دریافت کننده ساپونین و ستون ٤ مربوط به موش‌های دیابتی است که توسط بتا-کاروتن تیمار شده‌اند. شدت هر باند کمی شده و هر داده به صورت S.E.D±میانگین گزارش شده و نمادهای * تغییرات معنی‌دار را با P<۰/۰۵ نسبت به کنترل و نمادهای # تفاوت معنی‌دار را نسبت به گروه دیابتی نشان می‌دهد.



شکل ۳- مطالعات بافت پانکراس. رنگ آمیزی هماتوکسیلین / ائوزین در بافت پانکراس مربوط به همه موش‌های مورد آزمایش انجام گرفت و ناهنجاری‌های بافتی در موش‌هایی که آلوکسان دریافت کردند قبل و بعد از تیمار با ترکیبات گیاهی با موش‌های کنترل مقایسه شد. که این ناهنجاری‌های بافتی در موش‌های دیابتی تحت تیمار با ساپونین و بتا-کاروتن کاهش قابل توجهی یافته است. تصاویر مقاطع بافتی با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰× تهیه شده است.

بحث

براساس مطالعات انجام شده مهمترین علامت اختلالات متابولیک از جمله دیابت پس از افزایش قند و چربی خون، التهاب و آسیب اکسایشی می‌باشد که بافتهای کبد و پانکراس را درگیر می‌کند (۱٤، ۲٤). لذا ترکیبات

طبیعی با خاصیت ضد التهاب و ضد اکسایشی می‌تواند عوارض این بیماری را کاهش دهند (۸). ترکیبات طبیعی می‌توانند بدون ایجاد عوارض جانبی به مقدار زیاد و روزانه مصرف شوند لذا استفاده از آنها در درمان بیماری‌ها کاربرد فراوانی دارد (٦، ۱۱). براساس جدول ۲ غلظت گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول در سرم خون رت‌های دریافت کننده دوز حاد آلوکسان افزایش معنی‌داری پیدا کرده است که تائید کننده مدل دیابت است (۲، ۳). رت‌های دیابتی که بتا-کاروتن دریافت کردند کاهش قابل توجه در غلظت گلوکز، تری‌گلیسیرید و کلسترول در سرم خون نشان دادند بنابر نتایج حاصل، ساپونین اثر بیشتری در کاهش پارامترهای ذکر شده در رت‌های دیابتی نسبت به بتا-کاروتن داشته است (۲، ۸، ٢٤). در موش‌های دیابتی که بتا-کاروتن و ساپونین دریافت کردند میزان جذب گلوکز توسط بافت‌ها افزایش یافته است که احتمالا به علت بهبود عملکرد سلول‌های ترشح کننده انسولین و ترمیم آن‌ها باشد.

مصرف مواد طبیعی توسط رت‌های دیابتی همچنین تاثیر مثبت بر روی مصرف تری‌گلیسیرید داشته و یا تولید تری‌گلیسیرید آندوژن را کاهش داده است چرا که مقدار آن در سرم کاهش معنی‌داری یافته است. براساس مطالعات انجام گرفته ساپونین در درمان چاقی نیز کاربرد دارد و با افزایش سرعت متابولیسم لیپیدها مقدار آن‌ها را در خون کاهش می‌دهد (۱۹). مقدار VLDL و LDL در رت‌های دیابتی مصرف کننده ساپونین کاهش قابل توجهی را نشان داده است. البته بتا-کاروتن نیز تاثیر مشابهی دارد. نتایج پیشین حاکی از کاهش مقاومت به انسولین در اثر تیمار با ساپونین در رت‌های مدل چاقی است (٢٦). لذا به نظر می‌رسد یکی از تاثیرات مثبت ساپونین در مطالعه ما نیز کاهش مقاومت در برابر انسولین باشد. نتایج نشان دهنده افزایش مقدار HDL در رت‌های تیمار شده با ترکیبات طبیعی به ویژه ساپونین می‌باشد. ضمن اینکه تاثیر هر دو ماده طبیعی بر روی رت‌های کنترل (سالم) ناچیز و قابل صرف نظر کردن است.

مطالعات پیشین عملکرد آلوکسان را در بافت پانکراس اکسیداسیون گروه‌های SH، مهار آنزیم گلوکوکیناز، تولید رادیکال‌های آزاد و تغییر در هموستاز کلسیم داخل سلولی می‌داند. لذا یکی از عملکردهای اصلی آلوکسان آسیب اکسایشی است که می‌تواند ناشی از تولید رادیکال آزاد اکسیژن و یا تضعیف سیستم انتی اکسیدانی بدن باشد (٤، ٥، ٩). لذا در این مطالعه مقدار ROS و فعالیت آنزیم کاتالاز و سوپراکسید دیس‌موتاز در بافت پانکراس اندازه‌گیری شد. نتایج نشان دهنده افزایش حاد در مقدار ROS موجود در بافت پانکراس در رت‌های دیابتی می‌باشد. نقش استرس اکسایشی در بیماران دیابتی نیز اثبات شده است و تائید شده است که ناهنجاری‌های متابولیکی حاصل از دیابت باعث اختلال در عملکرد میتوکندری شده و منجربه تولید مقدار زیادی رادیکال آزاد اکسیژن می‌شود که سیستم دفاعی بدن قدرت خنثی کردن آن را ندارد (١٤). اما رت‌های دیابتی که مواد طبیعی را مصرف کرده‌اند با کاهش قابل توجهی در مقدار ROS مواجه شده‌اند که نشان دهنده خاصیت آنتی اکسیدانی این دو ماده می‌باشد (۱۳). بتا-کاروتن و ساپونین پتانسیل احیای منفی دارند و می‌توانند مولکول‌های ROS را احیا کنند و به این ترتیب خاصیت اکسایشی آن‌ها را خنثی سازند (۸، ٢٤). مقایسه نتایج مربوط به رت‌های دیابتی تیمار شده با بتا-کاروتن و ساپونین نشان می‌دهد تاثیر بتا-کاروتن در

خنثی سازی رادیکال‌های آزاد بسیار بیشتر از ساپونین می‌باشد.

نتایج همچنین نشان دهنده افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم کاتالاز در رت‌های دریافت کننده آلوکسان است که این می‌تواند یک نوع سازگاری علیه افزایش ROS باشد (۹)، به نظر می‌رسد در رت‌های تیمار شده با ترکیبات گیاهی چون مقدار ROS کاهش پیدا کرده است لذا نیاز به این سازگاری از بین رفته است و فعالیت کاتالاز به مقدار معمول نزدیکتر شده است. مطالعات پیشین نشان دهنده افزایش فعالیت کاتالاز در مراحل خاصی از بیماری دیابت می‌باشد (۲۸) مطابق شکل ۱ فعالیت SOD در رت‌های دیابتی کاهش یافته است که می‌تواند به علت آسیب به سلول‌های پانکراس و کاهش ظرفیت تولید آنزیم باشد. رت‌های دیابتی که مواد گیاهی آنتی اکسیدان دریافت کرده‌اند بهبود وضعیت بافت پانکراس و نیز افزایش فعالیت آنزیم SOD را نشان می‌دهند. لذا می‌توان نتیجه گرفت ساپونین و بتا-کاروتن علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی قادرند سیستم دفاعی علیه رادیکالهای آزاد را نیز تقویت کنند. البته بر طبق نتایج رفتار این دو آنزیم در رت‌های دیابتی متفاوت است که می تواند به علت حساسیت بیشتر آنزیم SOD در برابر تخریب باشد و یا مسیرهای تنظیم بیان ژن متفاوتی که برای این دو آنزیم وجود دارد (٦).

مطالعات نشان می‌دهد رت‌های دریافت کننده آلوکسان دچار التهاب شدید در بافت پانکراس می‌شوند که همین مسئله باعث افزایش نکروز و آپوپتوز نیز می‌شود (۲۲) که نتایج ما نیز تائید کننده این یافته‌ها است چون مقدار سیتوکین‌ها در رت‌های دیابتی به شدت افزایش یافته است. رت‌های دیابتی تیمار شده با ترکیبات گیاهی کاهش قابل توجهی را در مقدار IL-1β و TNF-α نشان می‌دهند که نشان دهنده کاهش وضعیت التهابی در پانکراس رت‌های دیابتی است. رت‌های دیابتی دریافت کننده ساپونین بهبود بیشتری را در وضعیت التهابی پانکراس و همچنین ظاهر مقاطع بافتی تهیه شده نسبت به رت‌های دیابتی تیمار شده با بتا-کاروتن نشان می‌دهد (۲۲، ۲۵).

نتیجه‌گیری

به طور کلی از بین دونوع تیمار انتخاب شده در این مطالعه که هر دو از ترکیبات ضد اکسایش با منشا گیاهی هستند هر کدام باعث بهبود جنبه‌های متفاوتی از علائم دیابت در مدل حیوانی شده‌اند (۱۲). بتا-کاروتن بیشتر بر روی جنبه‌های متابولیکی از جمله پروفایل لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها تاثیر داشته است ولی ساپونین باعث بهبود بیشتر در وضعیت التهابی بافت پانکراس و کاهش سلول‌های آپوپتوزی شده است. لذا به نظر می‌رسد استفاده همزمان از این دو ترکیب گیاهی و نیز همراه سازی آن‌ها با سایر داروهای موثر بر روی دیابت بتواند علائم بیشتری از دیابت را بهبود بخشد.

تشکر و قدردانی

مولفین بر خود لازم می دانند از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه تبریز و نیز داوران محترمی که نقطه نظراتشان در بهبود کیفیت مقاله نقش داشته است تقدیر و تشکر به عمل آورند.

منابع

1. Aebi H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105: 121-126.

2. Ahmed M.F., Kazim S.M., Ghori S.S., Mehjabeen S.S., Ahmed S.R., Ali S.M., Ibrahim M., 2010. Antidiabetic activity of Vinca rosea extracts in alloxan-induced

L. on alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacological research*, 46: 251-255.

11. Dias D.A., Urban S., Roessner U., 2012. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2): 303-336.

12. Dunn J.S., McLetchie N., 1943. Experimental alloxan diabetes in the rat. *The Lancet*, 242: 384-387.

13. Ghosh S., Derle A., Ahire M., More P., Jagtap S., Phadatare S.D., Patil A.B., Jabgunde A.M., Sharma G.K., Shinde V.S., 2013. Phytochemical analysis and free radical scavenging activity of medicinal plants Gnidia glauca and Dioscorea bulbifera. *PLoS One*, 8(12): 82529.

14. Jha J.C., Ho F., Dan C., Jandeleit-Dahm K., 2018. A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes. *Clinical Science*, 132(16): 1811-1836.

15. Karasu Ç., 2010. Glycoxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant treatment. *The open cardiovascular medicine journal*, 4: 240-256.

16. Wellen K.E., Hotamisligil G.S., 2005. Inflammation stress and diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 115(5): 1111-1119.

17. LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C., 1992. Evaluation of the probe 2' 7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical research in toxicology*, 5: 227-231.

18. Loria P., Lonardo A., Anania F., 2013. Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatology research*, 43(1): 51-64.

19. Marrelli M., Conforti F., Araniti F., Statti G.A., 2016. Effects of saponins on lipid metabolism: a review of potential health diabetic rats. *International Journal of Endocrinology*, 2010(1): 841090.

3. Amraie E., Farsani M.K., Sadeghi L., Khan T.N., Babadi V.Y., Adavi Z., 2015. The effects of aqueous extract of alfalfa on blood glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats. *Interventional Medicine and Applied Science*, 7(3): 124-128.

4. Bhattacharyya A., Chattopadhyay R., Mitra S., Crowe S.E., 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, 94(2): 329-354.

5. Campbell-Thompson M., Rodriguez-Calvo T., Battaglia M., 2015. Abnormalities of the exocrine pancreas in type 1 diabetes. *Current diabetes reports*, 15(10): 1-6.

6. Casano L.M., Martin M., Sabater B., 1994. Sensitivity of Superoxide Dismutase Transcript Levels and Activities to Oxidative Stress Is Lower in Mature-Senescent Than in Young Barley Leaves. *Plant Physiology*, 106: 1033-1039.

7. Chaudhury A., Duvoor C., Reddy Dendi V.S., Kraleti S., Chada A., Ravilla R., Marco A., Shekhawat N.S., Montales M.T., Kuriakose K., 2017. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. *Frontiers in endocrinology*, 8: 6.

8. Das T., Banerjee D., Chakraborty D., Pakhira M., Shrivastava B., Kuhad R., 2012. Saponin: role in animal system. *Veterinary World*, 5(4): 248-254.

9. den Besten H.M., Effraimidou S., Abee T., 2013. Catalase activity as a biomarker for mild-stress-induced robustness in Bacillus weihenstephanensis. *Applied and environmental microbiology*, 79(1): 57-62.

10. Dhandapani S., Subramanian V.R., Rajagopal S., Namasivayam N., 2002. Hypolipidemic effect of Cuminum cyminum

benefits in the treatment of obesity. *Molecules*, 21(10): 1404.

20. Martín-Timón I., Sevillano-Collantes C., Segura-Galindo A., del Cañizo-Gómez F.J., 2014. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: have all risk factors the same strength?. *World journal of diabetes*, 5(4): 444.

21. Matkovics B., Sasvari M., Kotorman M., Varga I.S., Hai D.Q., Varga C., 1997. Further prove on oxidative stress in alloxan diabetic rat tissues. *Acta Physiologica Hungarica*, 85: 183-192.

22. Mohammadi M., Gozashti M.H., Aghadavood M., Mehdizadeh M.R., Hayatbakhsh M.M., 2017. Clinical significance of serum IL-6 and TNF-α levels in patients with metabolic syndrome. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 6(1): 74-79.

23. Ōyanagui Y., 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Analytical biochemistry*, 142: 290-296.

24. Rodrigues H., Diniz Y., Faine L., Galhardi C., Burneiko R., Almeida J., Ribas B., Novelli E., 2005. Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis. *International journal of food sciences and nutrition*, 56(2): 79-85.

25. Roohbakhsh A., Karimi G., Iranshahi M., 2017. Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: a mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91: 31-42.

26. Shi Y., Liu Z., Gai L., Gao Y., He Y., Liu C., Zhang C., Zhou G., Yuan D., Yuan C., 2021. The preventive effect of total saponins from Panax japonicus on inflammation and insulin resistance in adipose tissue of mice induced by a high-fat diet. *Journal of Functional Foods*, 78: 104369.

27. Sugiura M., Nakamura M., Ogawa K., Ikoma Y., Yano M., 2015. High-serum carotenoids associated with lower risk for developing type 2 diabetes among Japanese subjects: Mikkabi cohort study. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 3(1): e000147.

28. Szaleczky E., Prechl J., Fehér J., Somogyi A., 1999. Alterations in enzymatic antioxidant defence in diabetes mellitus – a rational approach. *Postgraduate Medical Journal*, 75: 13-17.

29. Tiwari A.K., Rao J.M., 2002. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. *Current science*, 83(1): 30-38.

30. Tomita M., Kabeya Y., Okisugi M., Katsuki T., Oikawa Y., Atsumi Y., Matsuoka K., Shimada A., 2016. Diabetic microangiopathy is an independent predictor of incident diabetic foot ulcer. *Journal of diabetes research*, 2016: 5938540.

31. Towbin H., Staehelin T., Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 4350-4354.