Physiology and Pharmacology, 17 (4), 388-398

Winter 2014 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

The *Citrullus Colocynthis* pulp antioxidant activity on oxidative stress factors of liver in streptozotocin-induced diabetic rats

Fereshteh Ostovan[1], Hakimeh Olomi[2], Ali Gol[3*]

1. Faculty of Science, Payamnoor University, Iranshhar, Iran
2. Graduate University of Advanced Technology, Dept. of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Kerman, Iran
3. Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Shahid Bahonar, Kerman, Iran

Received: 3 Aug 2013 **Accepted: 21 Nov 2013**

Abstract

Introduction: Diabetes mellitus is a metabolic disorder and it is estimated that its annual incidence rate will continue to increase in the future worldwide. Increased oxidant factors and decreased antioxidant defense are two of the factors resulting in diabetes. In the present study, we aimed to investigate *Citrullus Colocynthis* pulp effects on oxidant and antioxidant factors of *liver* in streptozotocin-induced diabetic rats.

Methods: Thirty-two male rats were divided into four groups eight each: N (normal) group, N+C group, D (diabetic) group, and D+C group. Groups N and D received normal saline 2ml orally for 2 weeks and Groups N+C and D+C received 10mg/kg *Citrullus Colocynthis* pulp orally for 2 weeks. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at 65 mg/kg.

Results: Diabetic group had a significant increase in H_2O_2 (Hydrogen peroxide), MDA (malondialdehyde) and CAT (catalase) activity and a significant decrease in POD (peroxidase) activity in liver tissues compared to N and D groups. Group D+C had a significant decrease in H_2O_2, MDA, and CAT concentrations in liver tissues and significant increase in POD activity in liver tissues compared to D group.

Conclusion: These results suggest that treatment of diabetic rats with *Citrullus colocynthis* pulp decreased oxidant stress and support antioxidant defense in liver *STZ*-Induced diabetic rats.

Key words: Diabetes, *Citrullus Colocynthis,* oxidants stress, liver

* Corresponding author e-mail: agol@mail.uk.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۷ (٤)، ۳۸۸ – ۳۹۸
زمستان ۱۳۹۲

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فعالیت آنتی اکسیدانی پالپ هندوانه ابوجهل بر عوامل استرس اکسیداتیو بافت کبدی رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

فرشته استوان[۱]، حکیمه علومی[۲]، علی گل[۳*]
۱. بخش زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، ایرانشهر
۲. دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فنآوری پیشرفته کرمان، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه اکولوژی، کرمان
۳. بخش زیست شناسی، دانشگاه شهیدباهنر، کرمان

دریافت: ۱۲ مرداد ۹۲ پذیرش: ۳۰ آبان ۹۲

چکیده

مقدمه: دیابت ملیتوس یکی از مهمترین بیماری‌های مزمن و شایع است که آمار جهانی آن رو به افزایش است. عوامل اکسیدان و تضعیف سیستم دفاع آنتی اکسیدانی از عوامل ایجاد بیماری دیابت می‌باشند. هدف از انجام این پروژه بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی پالپ هندوانه ابوجهل بر برخی فاکتور های اکسیدانی و آنتی اکسیدانی در بافت کبدی رت های دیابتی می‌باشد.

روش ها: ۳۲ سر موش صحرایی نژاد ویستار به چهار گروه هشت تایی تقسیم شدند. ۱- گروه نرمال (N)، ۲- گروه نرمال+ پالپ هندوانه ابوجهل (N+C)، ۳- گروه دیابتی (D) و ۴-گروه دیابتی + پالپ هندوانه ابوجهل (D+C). گروه های N+C و D+C روزانه (۱۰mg/kg) پالپ هندوانه ابوجهل و گروههای N و D، ۲ میلی لیتر نرمال سالین را به مدت ۲ هفته به صورت گاواژ دریافت کردند. برای ایجاد دیابت، استرپتوزوتوسین (STZ) به مقدار ۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق شد.

یافته ها: دیابت باعث افزایش چشمگیر غلظت مالون دی آلدئید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، کاتالاز (CAT) و کاهش چشمگیر پراکسیداز (POD) بافت کبدی رت های دیابتی شد و تیمار رت های دیابتی با پالپ هندوانه ابوجهل به مدت دو هفته سبب کاهش غلظت مالون دی آلدئید (MDA)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، کاتالاز (CAT) و افزایش پراکسیداز (POD) بافت کبدی رت های گروه D+C نسبت به گروه D گردید.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می‌دهد که تیمار رت های دیابتی با پالپ هندوانه ابوجهل سبب کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش دفاع آنتی اکسیدانی ناشی از بیماری دیابتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: دیابت، هندوانه ابوجهل، استرس اکسیداتیو، کبد

مقدمه

دیابت ملیتوس یک سندروم است که به واسطه نقص در ترشح انسولین، عمل انسولین و یا هر دو مشخص می‌شود. نتیجه این بیماری متابولیسم آسیب دیده گلوکز و دیگر سوخت های بازده انرژی از قبیل لیپید و پروتئین می‌باشد [۲۶]. اخیراً به واسطه اندازه گیری فاکتورهای پراکسیداسیون لیپید، اکسیداسیون پروتئین‌ها؛ افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از نقص در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی هم در دیابت وابسته

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: agol@mail.uk.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

به انسولین و هم دیابت مستقل از انسولین نشان داده شده است [۱۴]. تحت شرایط نرمال سطوح پراکسیداسیون لیپید و تولید رادیکال‌های آزاد به واسطه انواع مکانیسم‌های دفاع سلولی از قبیل آنتی اکسیدان های آنزیمی (کاتالاز، پراکسیداز و...) و غیر آنزیمی (گلوتاتیون، ..) کنترل می‌شوند [۲۱]. سطوح نرمال این آنزیم‌های آنتی اکسیدانی برای ریشه کن کردن رادیکال‌های آزاد کافی می‌باشند و از آسیب بافتی جلوگیری می‌کنند و عملکرد نرمال سلول را حفظ می‌کنند [۸].

اما محققین پیشنهاد می‌کنند که رادیکال‌های اکسیژن فاکتور شرکت کننده مهمی در عوارض ناشی از دیابت ملیتوس می‌باشند و تعدادی از محققین نشان دادند که پارامترهای استرس اکسیداتیو در طول دیابت تغییر می‌کنند. استرس اکسیداتیو در شروع اولیه دیابت و هم پیشرفت عوارض آن دخیل می‌باشد. رادیکال‌های آزاد اکسیژن در انواع وسیعی از عملکردهای سلولی در گیر می‌باشند اما آن‌ها می‌توانند برای هومئوستاز سلول حیاتی باشند و یا سمیت بالایی داشته باشند [۱۵]. مکانیسم دقیق ایجاد استرس اکسیداتیو در دیابت روشن نیست، هر چند مدارک موجود ارتباط بین افزایش تولید گونه های واکنش اکسیژن نظیر سوپراکسید [۱۱] یا هیدروژن پراکسید [۱۶] یا کاهش دفاع آنتی اکسیدانی و افزایش استرس اکسیداتیو را نشان می‌دهند [۱۱]. این مکانیسم‌ها شامل اتواکسیداسیون گلوکز، فعال شدن مسیر پلی ال، تغییر وضعیت گلوتاتیون احیاء سلولی، غیر فعال شدن آنزیم‌های آنتی اکسیدان و اختلال در متابولیسم پروستاگلاندین‌ها و نیتریک اکسید و مقاومت به انسولین می‌باشد [۷]. دیابت همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را در انواع بافت‌های دیابتی از قبیل کبد، آئورت، شش و کلیه را تغییر می‌دهد [۴۰].

کبد اندامی موثر در حفظ و برقراری سطح گلوکز خون در محدوده طبیعی بوده و افزایش قند خون منجر به عدم تعادل در واکنش‌های اکسیداسیون- احیاء در درون هپاتوسیت ها می‌شود، به این صورت که هیپوگلیسمی از طریق افزایش AGEs (محصولات انتهایی گلیکوزیله) باعث تسهیل در تولید رادیکال‌های آزاد از طریق اختلال در تولید گونه های اکسیژن واکنشی مثل سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز می‌گردد [۱۹]. علاوه بر این کبد ارگان مرکزی فرایند اکسیداتیو و سمیت زدایی کننده ترکیبات مضر می‌باشد و نشان داده شده است که بیومارکرهای استرس اکسیداتیو در کبد در مراحل اولیه در دیابت ملیتوس افزایش می‌یابند [۳۶]. بدین ترتیب مشخص می‌شود که آسیب دیابتی کبد توسط فاکتورهای متعددی ایجاد گردیده و تنها با مهار هیپوگلیسمی قابل کنترل نیست [۲۸]. به عبارت دیگر اگر چه در مراحل اولیه بیماری آسیب کبد توسط هیپرگلیسمی القاء می‌شود، اما پیشرفت آن به ابقاء هیپرگلیسمی ارتباط ندارد [۴۲]. به طور کلی بیماران دیابتی افزایش در مالون دی آلدئید (MDA) پلاسمایی و کاهش در گروه سولفیدریل، آلفا-توکوفرول و پارامترهای آنتی اکسیدانی را نشان می‌دهند [۳۰].

آنتی اکسیدانها به عنوان یک دفاع مهم بر علیه عوامل اکسیدان ایجاد کننده سمیت عمل می‌کنند. پس با توجه به نقش رادیکال‌های آزاد در دیابت یکی از عرصه های مورد تحقیق در کنترل این بیماری؛ کاهش میزان عوامل اکسیدان است [۵]. در این راستا طی مطالعاتی اثر آنتی اکسیدانها در پیشگیری و یا کاهش صدمات وارده از طریق رادیکال‌های آزاد در دیابت مورد بررسی قرار گرفته است [۳]. بنابراین یک داروی مناسب و ایده آل برای درمان دیابت بایستی دارای هر دو خاصیت کاهندگی قند خون و آنتی اکسیدانی باشد [۱۵].

شکل گیری تعدادی از داروها بر اساس آنتی اکسیدانها برای پیشگیری و درمان دیابت می‌باشد. که در سه دهه گذشته مشهود است [۱۰]. این به مقدار زیادی به جنبه های مثبت تحقیقات آنتی اکسیدانی طبیعی نسبت داده می‌شود. ترکیبات فلاونوئیدی و فنولی به طور وسیعی در گیاهان توزیع شده‌اند که برای اعمال اثرات بیولوژیکی چندگانه شامل آنتی اکسیدانی و توانایی حذف کنندگی گونه های اکسیژن واکنشی گزارش شده است [۳۱]. یکی از این گیاهان دارویی هندوانه ابوجهل است که به طور خودرو در بیابانهای بسیاری از کشورهای حاره‌ای نظیر ایران و غرب عراق رشد می‌کنند [۱۲]. از میوه این گیاه برای درمان اختلالات هاضمه و دیابت استفاده می‌شود. هر چند مسمومیت حاد بعد از مصرف طولانی مدت این گیاه گزارش شده است [۱]. ترکیبات فنولیک جدا شده از این گیاه دارای فعالیت هیپوگلیسمیک، آنتی اکسیدانی و آنتی کارسینوژنی می‌باشد و نقش خیلی مهمی در حذف و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد دارند [۶].

هدف ما از انجام این تحقیق با توجه به شیوع بالا و عوارض جبران ناپذیر بیماری دیابت و احتمالاً نقش رادیکال‌های آزاد در ایجاد و پیشرفت این بیماری و درمان گیاهی این بیماری، سنجش و مقایسه پارامترهای استرس اکسیداتیو از قبیل مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و فاکتورهای آنتی اکسیدانی از قبیل کاتالاز (CAT) و پراکسیداز (POD) در بافت کبدی نمونه‌های نرمال، دیابتی و تیمار شده با هندوانه ابوجهل می‌باشد.

مواد و روش ها

هندوانه ابوجهل از عطاری در کرمان خریداری شد و سپس پالپ میوه‌ها از پوست و دانه های میوه جدا شد و در آسیاب پودر شد. پودر آماده شده در جای خشک و خنک دور از نور خورشید نگه داری شد.

در این طرح آزمایشی از رت های نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۷۰-۲۳۰ خریداری شده از حیوان خانه دانشکده علوم دانشگاه شهید باهنر کرمان استفاده شده است. حیوانات مورد آزمایش یک هفته قبل از آزمایش جهت سازگاری با محیط جدید در حیوان خانه دانشکده علوم بخش زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی با دمای ۲۵-۲۳ درجه سلسیوس قرار داده شدند و در مصرف آب و غذا محدودیتی نداشتند.

برای القای دیابت در رت ها از دوز ۶۵ میلی گرم STZ به ازای هر کیلو گرم وزن بدن استفاده شد. داروی توزین شده در ۰/۳۳ میلی لیتر نرمال سالین خنک حل شده و به صورت داخل صفاقی به رت ها تزریق می‌شد. بعد از ۷۲ ساعت موش بطور ناشتا در انکوباتور به وسیله CO_2 بیهوش شده و قند خون آنها با استفاده از گلوکومتر اندازه گیری می‌شد و قند خون بالای ۳۰۰ به عنوان دیابتی در نظر گرفته می‌شد.

نحوه گروه بندی حیوانات: در این آزمایش ۳۲ سر رت به چهار گروه به شرح زیر تقسیم بندی شدند:

۱) گروه نرمال (N): به مدت دو هفته روزانه ۲ میلی لیتر نرمال سالین را به واسطه دو بار گاواژ دریافت می‌کردند.

۲) گروه دیابتی (D): به مدت دو هفته روزانه ۲ میلی لیتر نرمال سالین را به واسطه دو بار گاواژ دریافت می‌کردند.

۳) گروه نرمال + 10 mg/kg.bw پودر پالپ هندوانه ابوجهل (N+C10): به مدت دو هفته 10 mg/kg.bw پودر پالپ هندوانه ابوجهل حل شده در ۲ میلی لیتر نرمال سالین را دریافت می‌کردند.

۴) گروه دیابتی + 10 mg/kg.bw پودر پالپ هندوانه ابوجهل (D+C10): به مدت دو هفته 10 mg/kg.bw پودر پالپ هندوانه ابوجهل حل شده در ۲ میلی لیتر نرمال سالین را دریافت می‌کردند.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در ۲۴۰ نانومتر و با روش (۱۹۸۱) Dhindsa و Motowe انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH= ۷ و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی مولار می‌باشد (mix catalase). با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بافتی به مخلوط ذکر شده، واکنش شروع می‌شود. تغییرات جذب (تفاضل جذب در زمان شروع واکنش از جذب در زمان یک دقیقه)؛ پس از شروع واکنش محاسبه گردید.

میزان پراکسید هیدروژن موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی $\varepsilon = 0/28 Mm^{-1}\ cm^{-1}$ و فرمول $A= \varepsilon bc$ محاسبه شد که نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد. A معادل جذب خوانده شده، ε ضریب خاموشی، c غلظت H_2O_2 و b عرض کووت می‌باشد.

فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره بافتی، در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی مول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه گیری میزان جذب ترا گایاکول تشکیل شده از گایاکول در نتیجه فعالیت پراکسیداز در ۴۷۰ نانومتر انجام گرفت.

مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷، پراکسید هیدروژن (۰/۳٪) و گایاکول ۱٪ می‌باشد (mix peroxidase).

واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۲/۵ ml مخلوط واکنش در ۲۵ درجه سلیسیوس آغاز گردید. میزان

جذب تترا گایاکول (حاصل از اکسید شدن گایاکول) در ۴۷۰ نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه نمودن عصاره بافتی و پس از یک دقیقه خوانده شد. با استفاده از تغییرات جذب در یک دقیقه در ۴۷۰ نانومتر؛ ضریب خاموشی تترا گایاکول $\varepsilon = ۲۵/۵\ mMol^{-1}\ cm^{-1}$ و فرمول $A=\varepsilon bc$، مقدار تترا گایاکول تشکیل شده محاسبه شد (۱۹۹۱) Plewa et al.

فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۲۰ میکرولیتر عصاره به دست آمده از روش (۱۹۷۶) Bradford گزارش شد.

$$\boldsymbol{U}= \frac{\text{تغییرات جذب در دقیقه}}{\text{ضریب خاموشی}}$$

$$\text{فعالیت آنزیم} = \frac{\text{واحد آنزیمی } (U)}{\text{غلظت در پروتئین ۲۰ میکرولیتر عصاره}}$$

استخراج پروتئین: برای تهیه عصاره بافتی جهت سنجش فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و پروتئین از روش (۱۹۷۶) Bradford استفاده شد. در این روش ۰/۵ گرم از بافت مورد نظر را برداشته و در ۳cc بافر فسفات ۵۰ میلی مولار هموژن می‌شود و سپس عصاره حاصل در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار با سرعت بالا در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شوند. به منظور سنجش غلظت پروتئین به لوله های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی لیتر عصاره بافتی حاصل و ۵ میلی لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از ۲۵ دقیقه جذب آنها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

به منظور تهیه محلول بیوره، ۰/۱ گرم کوماسی بریلیانت بلو G250 در ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ به مدت یک ساعت حل گردید، سپس ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفوریک ۸۵٪ قطره قطره به آن افزوده شده. در پایان حجم کل محلول به کمک آب مقطر به یک لیتر رسانده شده، محلول حاصل با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید.

رسم منحنی استاندارد پروتئین (روش برادفورد): به منظور رسم منحنی استاندارد مقدار ۱/۴ گرم استاندارد آلبومین گاوی در یک لیتر آب مقطر حل شد و از این محلول غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰،۷۰۰، ۱۴۰۰ و ۲۸۰۰ میلی گرم در لیتر ساخته شد. کلیه مراحل کار بر روی آنها توسط معرف بیوره، همانطور که قبلاً در نمونه های مجهول توضیح داده شده بود، تکرار گردید. جذب هریک در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر خوانده شد. برای تهیه غلظت‌های پروتئین‌های نمونه های مجهول از منحنی استاندارد حاصل استفاده گردید.

روش سنجش پراکسید هیدروژن: سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش (۲۰۰۰) Velikova et al انجام شد. ۰/۱ گرم از بافت مورد نظر در 1cc تری کلرو استیک اسید ۰/۱ (TCA) به وسیله دستگاه هموژنایزر هموژن می شود و بعد عصاره حاصل در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار با سرعت بالا در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می شوند. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول سانتریفوژ شده به ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (PH=۷) و ۱ میلی لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه می گردد و جذب در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده می شود. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $۰/۲۸\ M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه گردید و بر حسب میکرومول بر گرم وزن بافت گزارش شد.

$$H_2O_2 \text{ غلظت} = \frac{\text{تغییرات جذب}}{\text{ضریب خاموشی}}$$

اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید (MDA): اندازه گیری غلظت MDA به واسطه روش (۱۹۶۸) Heath and Packer انجام گرفت. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت مورد نظر در ۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ (TCA) هموژن می شود و محلول حاصل با استفاده از سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد.

به یک میلی لیتر عصاره سانتریفوژ شده ۴ میلی لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود؛ اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد حمام آبگرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید.

شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است، جذب بقیه رنگریزه های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از

این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155\ cm^{-1}Mm^{-1}$ استفاده شد.

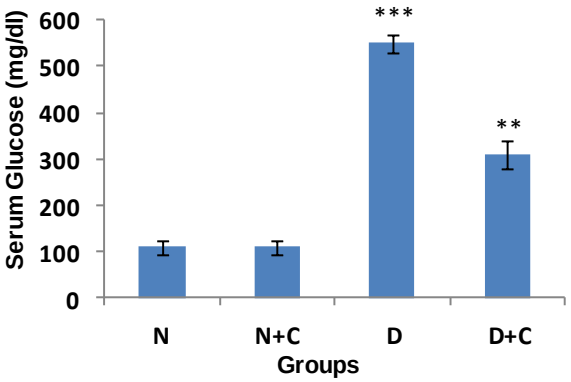
$$\text{غلظت } MDA = \frac{\text{تغییرات جذب}}{\text{ضریب خاموشی}}$$

روش تجزیه وتحلیل داده‌ها: داده‌های حاصل از مطالعه حاضر با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SPSS و میانگین داده ها در گروه های مختلف با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و پس آزمون Tukey آنالیز گردیدند. نتایج نهایی به صورت SEM±mean گزارش شدند و $p<0/05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

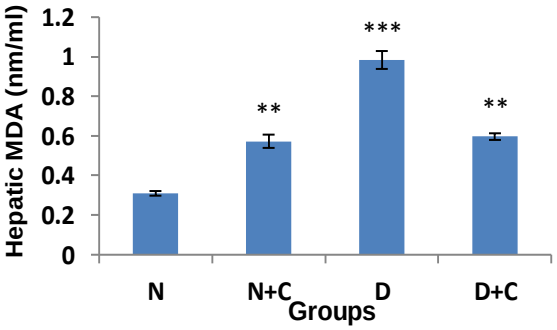
یافته ها

گلوکز: اثر پودر پالپ هندوانه ابوجهل بر سطح سرمی گلوکز در نمودار ۱ آورده شده است. گروه D افزایش معنی دار ($p<0.001$) را نسب به گروهای N و N+C نشان می دهد. گروه D+C کاهش معنی دار ($p<0.01$) را نسبت به گروه D و افزایش معنی دار ($P<0.01$) را نسبت به گروه های N و N+C نشان می دهد.

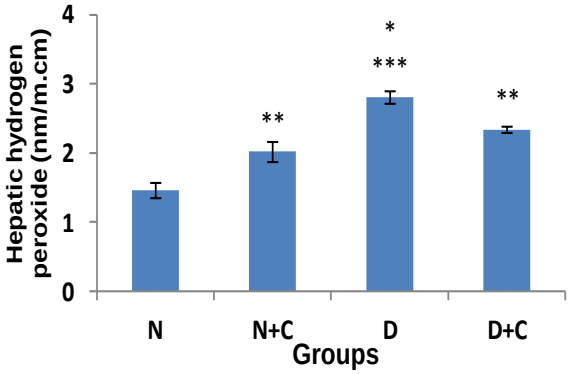
مالون دی آلدئید (MDA): اثر پودر پالپ هندوانه ابوجهل بر میزان MDA بافت کبدی در نمودار ۲ آورده شده است. گروه D افزایش معنی دار ($p<0.001$) را نسبت به گروه



شکل ۱- اثر مصرف خوراکی پالپ هندوانه ابوجهل بر سطوح سرمی گلوکز. هر ستون نمایانگر Mean±SEM و n=8 می باشد. ** اختلاف معنی دار P<0.01 نسبت به گروههای N ,N+C و D. *** اختلاف معنی دار P<0.001 نسبت به گروههای N+C و N.



شکل۲- اثر مصرف خوراکی پالپ هندوانه ابوجهل بر سطوح مالون دی آلدئید (MDA). بافت کبدی. هر ستون نمایانگر Mean±SEM و n=8 می باشد. ** اختلاف معنی دار P<0.01 نسبت به گروه N *** اختلاف معنی دار P<0.001 نسبت به گروههای N , N+C و D+C.

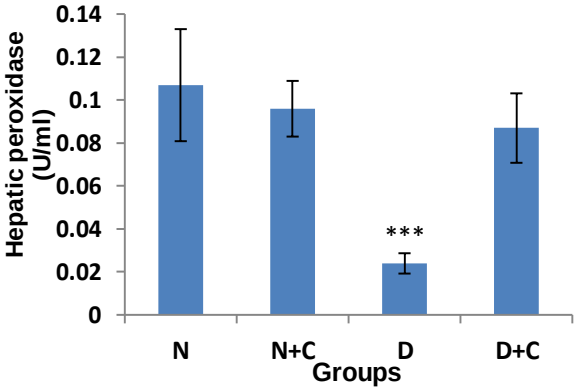


شکل ۳- اثرمصرف خوراکی پالپ هندوانه ابوجهل بر سطوح پراکسید هیدروژن (H_2O_2) بافت کبدی. هر ستون نمایانگر Mean±SEM و n=8 می باشد. *اختلاف معنی دار P<0.05 با گروه N+C. **اختلاف معنی دار P<0.01 نسبت به گروه N. *** اختلاف معنی دار P<0.001 نسبت به گروه N.

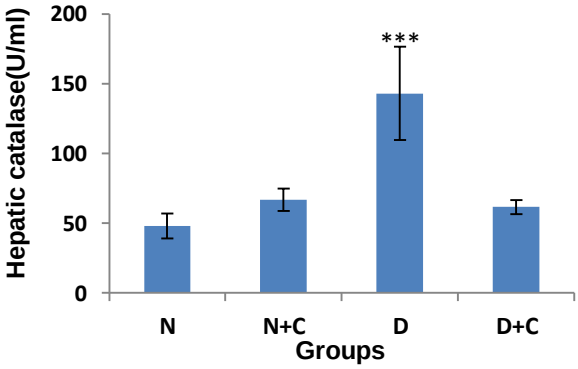
N را نشان می دهد. همچنین گروه های N+C و D+C افزایش معنی دار ($p<0.01$) را نسبت به گروه N نشان و کاهش معنی دار ($p<0.001$) را نسبت به گروه D نشان می دهند.

پراکسید هیدروژن (H_2O_2): اثر پودر پالپ هندوانه ابوجهل بر میزان H_2O_2 بافت کبدی در نمودار ۳ آورده شده است. گروه D افزایش معنی دار ($p<0.001$) و گروه های N+C و D+C افزایش معنی دار ($p<0.01$) را نسبت به گروه N نشان می دهند. همچنین گروه D افزایش معنی دار ($p<0.05$) را نسبت به گروه N+C نشان می دهد. گروه D+C کاهشی را نسبت به گروه D نشان می دهد اما این کاهش معنی دار نمی باشد.

پراکسیداز (POD): اثر پودر پالپ هندوانه ابوجهل بر میزان فعالیت POD بافت کبدی در نمودار ۴ آورده شده است.



شکل ٤- اثرمصرف خوراکی پالپ هندوانه ابوجهل بر سطوح پراکسیداز بافت کبدی. هر ستون نمایانگر Mean±SEM و n=8 می باشد. *** اختلاف معنی دار P<0.001 نسبت به گروه N ,N+C و D+C.



شکل ٥- اثرمصرف خوراکی پالپ هندوانه ابوجهل برسطوح کاتالاز بافتی کبدی. هر ستون نمایانگر Mean±SEM و n=8 می باشد.
*** اختلاف معنی دار P<0.001 نسبت به گروه هایD+C، N+C و N.

گروه D کاهش معنی دار (p<0.001) را نسبت به گروههای N و N+C نشان می دهد. همچنین گروه D+C افزایش معنی دار (p<0.001) را نسبت به گروه D نشان می دهد.

کاتالاز (CAT): اثر پودر پالپ هندوانه ابوجهل بر میزان فعالیت CAT بافت کبدی در نمودار ۵ آورده شده است. گروه D افزایش معنی دار (p<0.001) را نسبت به گروه های N و N+C را نشان می دهد همچنین گروه D+C کاهش معنی دار (p<0.001) را نسبت به گروه D نشان می دهد.

بحث

شواهد زیادی نشان می دهد که هیپرگلیسمی یکسری حوادث بیوشیمیایی را هدایت می کند که سبب تولید سطوح بالای ROS (گونه های اکسیژن واکنشی) و استرس اکسیداتیو می شود [۲۹]. دیابت ناشی از STZ یک مدل آزمایشگاهی خیلی مشخص شده برای دیابت نوع ۱ می باشد که در ایجاد اختلال انتخابی در سلول های β جزایر پانکراس مناسب می باشد که سبب پیشبرد کمبود و یا نقص ترشح انسولین و هیپرگلیسمی می شود [۴۳]. اثرات دیابتوژنی STZ اساساً با تولید ROS و با پیشبرد سمیت در سلول های پانکراسی نسبت داده می شود که سنتز و آزاد سازی انسولین کاهش می یابد [۴۳]. گلوکز از طریق اتوکسیداسیون و گلیکاسیون غیر آنزیمی پروتئین ها و STZ نیز با تحریک تولید پراکسید هیدروژن در محیط in vitro در سلول های β پانکراس موجب افزایش تولید رادیکال های آزاد می گردد [۴].

نتیجه اثرات پالپ هندوانه ابوجهل بر برخی فاکتورهای استرس اکسیداتیو از قبیل MDA و پراکسید هیدروژن و آنزیمهای دفاع آنتی اکسیدانی از قبیل کاتالاز و پراکسیداز در بافت کبدی رت های دیابتی شده به واسطه STZ در این مطالعه بررسی شده است. پراکسیداسیون لیپید یک علامت از استرس اکسیداتیو است که در برهمکنش با اسیدهای چرب اشباع نشده مطرح می شود و شکل گیری محصولاتی از قبیل MDA، 4-HNE (۴-هیدروکسی نون انول) را پیش می برد که سبب آسیب به ترکیبات غشاء سلول، نکروز سلول و التهاب می شود [۳۷].

شواهد زیادی پیشنهاد می کند که افزایش پراکسیداسیون لیپید یک نقش مهم در پیشرفت دیابت به واسطه تغییر گرادیان سیالیت انتقال دو لایه ای غشاء بازی می کنند که می توانند فعالیت آنزیم ها و گیرنده های متصل به غشاء را مختل کند [۱۳]. در این مطالعه افزایش قابل توجهی در پراکسیداسیون لیپید در کبد رت های دیابتی وجود دارد که به واسطه اندازه گیری MDA اندازه گیری شده است.

این نتایج موافق با چند مطالعه می باشد که افزایش در MDA در کلیه، کبد و سرم حیوانات دیابتی را گزارش کرده اند [۲۰]. این یافته ها با همدیگر پیشنهاد می کنند که قرار گرفتن در معرض سطوح بالای گلوکز ممکن است تولید ROS را به واسطه گلیکاسیون غیر آنزیمی پروتئین ها و اتواکسیداسیون گلوکز بالا ببرد که در نتیجه آسیب در تمامیت ساختار و عملکرد بافت کبدی را تحریک می کند.

علاوه بر پراکسیداسیون افزایش یافته لیپید، تحت شرایط

دیابتی، استرس اکسیداتیو افزایش یافته در نمونه های دیابتی می تواند در نتیجه نقص سیستم دفاع آنتی اکسیدانی ایجاد شود [۳۳]. آنتی اکسیدان ها خط اول عوامل دفاعی بر علیه ROS در ارگانیسم ها شامل کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و ... می باشد، که یک نقش مهم در حذف کردن واسطه های سمی در اکسیداسیون ناقص بازی می کند. کاتالاز و پراکسیداز دو آنزیم بزرگ حذف کننده ROS هستند، که تبدیل پراکسید هیدروژن به آب را کاتالیز می کنند. یک کاهش در فعالیت این آنتی اکسیدانها ممکن است یک افزایش در قابلیت استفاده سوپراکسید و پراکسید هیدروژن را پیش می برد که در حقیقت رادیکال هیدروکسیل تولید می کند و نتیجه آن آغاز و پیشرفت پراکسیداسیون لیپید است [۲۴].

در این راستا در مطالعه حاضر کاهش در آنزیم های آنتی اکسیدان پراکسیداز و افزایش در آنزیم کاتالاز در کبد رت های دیابتی وابسته به افزایش مداوم در پراکسیداسیون لیپید این بافت مشاهده می شود. مطابق با این نتایج، مطالعات دیگری ثابت کردند که فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان از قبیل کاتالاز و پراکسیداز در بافت های رت های دیابتی کاهش می یابد و این ممکن است در نتیجه اثرات زیان آور ROS باشد [۳۸]. یک مکانیسم احتمالی برای این کاهش پراکسیداز در نتیجه غیر فعال سازی این آنزیم در اثر تجمع بالای ROS می باشد و یا به واسطه گلیکاسیون غیر آنزیمی در اثر هیپوگلیسمی باشد که به طور وسیعی در دیابت گزارش شده است [۳۴].

افزایش کاتالاز در کبد رت های دیابتی در این مطالعه با مطالعه Leelavinothan و همکارانش [۲۵] که فعالیت کاتالاز در مغز را بررسی کرده اند مخالفت دارد و با نتایج [۲۲] kakar، [۳۹] soo-yeuki و همکارانش که فعالیت این آنزیم را در کبد بررسی کردند، مطابقت دارد. این تناقض در نتایج می تواند ناشی از اختصاصیت بافتی، تغییرات در شدت دیابت و پراکسیداسیون لیپیدی، طول دوره دیابت، تغذیه و درمان آنها [۴۱] و یا دیگر شرایط آزمایش باشد. تغییر فعالیت کاتالاز که در دیابت ایجاد می شود ممکن است پاسخی به افزایش پراکسیدهیدروژن در این بیماران باشد. که افزایش پراکسید هیدروژن نیز در مطالعه حاضر در بافت کبدی رت های دیابتی مشاهده می شود. پراکسید هیدروژن به واسطه مکانیسم های متعددی از قبیل گلیکوزیلاسیون cu-zn-SOD سبب غیر فعال سازی این آنزیم آنتی اکسیدان می شود که یک شرکت کننده برای آسیب اکسیداتیو در طول شکل گیری آنیون سوپراکسیدو پراکسیدهیدروژن می باشد [۱۷]. همچنین پیشنهاد می شود، که هیپوانسولینمیا فعالیت آنزیم استیل کوا اکسیداز را افزایش می دهد،که سبب بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب می شود و در طول فرایند بتا اکسیداسیون پراکسید هیدروژن تولید می شود [۱۸].

تیمار رت های سالم با پالپ هندوانه ابوجهل (N+C) نشان داد که پراکسید هیدروژن و MDA نسبت به گروه نرمال افزایش یافته است و فعالیت پروکسیداز کاهش و فعالیت کاتالاز افزایش را نسبت به گروه نرمال نشان می دهد. این تغییرات در گروه N+C مطابق با مطالعات محققینی می باشد که نشان دادند که مصرف هندوانه ابوجهل در رت های سالم سبب افزایش استرس اکسیداتیو می شود [۲]. به طوریکه محققین نشان دادندکه عصاره هندوانه ابوجهل پراکسیداسیون لیپید و شکل گیری H_2O_2 را تحریک می کند و تولید رادیکال های آزاد را القاء می کندکه سبب آسیب بافتی می شوند. همچنین پیشنهاد شده است که هندوانه ابوجهل اثرات سمی بر سلول های کبدی دارد و ممکن است نکروز هپاتوسیت ها و فیبروز کبدی را القاء کند [۲].

از طرف دیگر مطالعه ما ثابت کرد که تیمار رت های دیابتی با 10mg/kg پالپ هندوانه ابوجهل به مدت دو هفته از افزایش در میزان پراکسید هیدروژن و MDA و فعالیت کاتالاز و کاهش فعالیت پراکسیداز در کبد رت های دیابتی شده به واسطه STZ ممانعت می کند. این نتایج با کاهش استرس اکسیداتیو در دیگر مطالعات مطابقت دارد که تیمار رت های دیابتی با هندوانه ابوجهل به طور وسیعی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان را اصلاح می کند و از افزایش در پراکسیداسیون لیپید در نمونه های دیابتی تجربی جلوگیری می کند [۶، ۳۵]. همچنین محققین نشان دادندکه قسمت میو های و پالپ هندوانه ابوجهل به خاطر فعالیت اکسیدانی شان کشف شده اند [۹، ۲۵].

Kumar نشان داد که ترکیبات فنولیک جدا شده از هندوانه ابوجهل دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی

کارسینژنی می باشند و آنها نقش خیلی مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال های آزاد دارند و آنها نه نتها حاوی متابولیت های مینرال و اولیه می باشند، همچنین یک طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه با پتانسیل آنتی اکسیدانی را دارند [۲۳].

احتمال می رود که نقش پالپ این گیاه در افزایش دفاع آنتی اکسیدانی مربوط به غناء فلاونوئیدی آن و یا ناشی از اثر مستقیم ترکیبات پالپ این گیاه بر خود آنزیم کاتالاز و پراکسیداز و یا بیان ژن آنها باشد. ممکن است پالپ این گیاه قادر باشد با اثرات سمی القائ شده به واسطه STZ در سلول های β مقابله کند.

اگر چه نتایج این مطالعه نشان می دهد که این گیاه به نوعی باعث تغییر فعالیت کاتالاز و پراکسیداز و افزایش دفاع آنتی اکسیدانی می گردد و می تواند مزایای عملی در مقابله با تغییرات پاتولوژیکی که به وسیله رادیکال های آزاد در دیابت ایجاد می شود، ایفا کند، اما مطالعات بعدی هچون جدا کردن فراکسیون های متعدد پالپ این گیاه، مطالعه بیان ژن کاتالاز و پراکسیداز و مطالعات فیتوشیمیای مورد نیاز است تا بتوان مکانسیم عمل آن و استفاده آن و کاهش عوارض دیابت ملیتوس نشان داد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نموده‌اند بخصوص از همکاری پرسنل محترم پژوهشکده علوم محیطی گروه اکولوژی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فنآوری پیشرفته کرمان تشکر و قدردانی می شود.

References

[1] Asfi IA. Some pharmacological studies on Citrullus colocynthis. ***J herb spices Med plant*** 2 (1994) 65-79.

[2] Barth A, Muller D, Durrling K. In vitro investigation of a stan dardized dried extract of Citrullus colocynthis on liver toxicity in adult rats. ***Exp Toxicol Pathol*** (2002) 54 223-30.

[3] Bassiouni EA, Helmy MH, Abou Rawash N, Zoghby SM, Kamel MA, bou Rayah AN. Embryopathy in experimental diabetic gestation: assessment of oxidative stress and antioxidant defense. ***Br J Biomed Sci*** 62 (2005) 71-6.

[4] Bhooshan K, Syed P, Rizvi I. Plant polyphenols as dietary antioxidants inhuman health and disease. ***Oxid Med Cell Longev*** 2 (2009) 270-278.

[5] Bulter R, Morris AD, Belch JJE, Hill A, Struthers AD. Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetes with mild hypertension. ***Hypertension*** 35 (2000) 746-51.

[6] Chanada S, Dave R, Kaneria M. In vivo antioxidant property of some Indian medical plants. ***Res J Med Plant*** 5 (2011) 169-179.

[7] Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published deta from 20 studies of 95,783 individuals fllowed for 124 years. ***Diabetes Care*** 22 (1999) 233-240.

[8] Dallak M. In vivo, hypolipidemic and antioxidant effects of Citrullus colocynthis pulp extract in alloxan-induced diabetic rats. ***Afr J Biotechnol*** 10 (2011) 9898-9903.

[9] Dallak M, Al-Khateeb M, Abbas M, Elessa R, Al-Hashem F, Bashir N, Khalil M. In vivo, Acute, Normo-hypoglycemic Antihyperglycemic Actions of Orally Administered Ethanol Extract Citrullus colocynthis (L.) Schrab. ***Am J Biochem Biotechnol*** 5 (2009) 119-126.

[10] Devasagayam T, Tilak J, Boloor K, Sane K, Ghaskadbi S, Lele R, Review: Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects, ***J Assoc Phys India*** 52 (2004) 794-804.

[11] Dierkx N, Horvath G, Vertommen J, Van Devilet J, De Leeuw I, Manuel-Y-Keenoy B. Oxidative stress statuse in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. ***Eur J Clin Nutr*** 57 (2003) 999-1008.

[12] Diwan H, Abdel-Hassan IA, Mohammed ST. Effect of saponin on mortality and histopathological changes in mice. ***East Mediterr Health J*** 6 (2000) 345-351.

[13] Dmitriev L.F, Titov VN. Lipid peroxidation in relation to ageing and the roleof endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases, ***Ageing Res Rev*** 9 (2010).

[14] Evans RW, Orchard TJ. Oxidized lipids in insulin-dependent diabetes mellitus: a sex-diabetes interaction? ***Metabolism*** 43 (1994) 1196-1200.

[15] Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. ***Lab Invest*** 47 (1982) 412-26.

[16] Gallou G, Ruelland A, Legras B, Maugendre D, Allannic H, Cloarec L. Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. ***Clin Chim Acta*** 214 (1993) 227-234.

[17] Giacco, Brownlee. Oxidative stress and diabetic complications. ***Circ Res*** 107 (2010) 1058e1070.

[18] Horie S, Ishii H, Suga T. Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in diabetic rat liver. ***J Biochem*** 90 (1981) 1691-6.

[19] Jandeleit-Dahm KA, Lassila M, Allen TJ. Advanced glycation end products in diabetes associated atherosclerosis and renal disease: interventional studies. ***Ann N Y Acad Sci*** 1043 (2005) 759-66.

[20] Jin L, Xue H.Y, Jin L.J, Li S.Y, Xu Y.P. Antioxidant and pancreasprotective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes, ***Eur J Pharmacol*** 582 (2008) 162e167 (I1-47).

[21] Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. ***Ann NY Acad Sci***. 1011 (2004) 168-176.

[22] Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid Peroxidation and Activity of Indian J Pharmacol Antioxidant Enzymes in Diabetic Rats. ***Mol Cell Biochem*** (1995) 151:113-9. (B19)

[23] Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Thomas TP, HillM, Khaper N, Singal PK. Probucol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopa thy. ***Nutrition*** 11 (1995) 551-554.

[24] Kinalski M, Sledziewski A, Telejko B, Zarzycki W., Kinalska I. Lipidperoxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induce-diabetes, ***Acta Diabetol***. (2000) 37: 179e183. (I1-49)

[25] Kumar S, Kumar M, Manjusha K, Sraoha N, Vashishta B. Antioxidant and free radical scanvenging potential of Colocynthis citrullus (L.) Schard. Methanolic fruit extract. ***J Acta Pharm*** 58 (2008) 215-220.

[26] Latha M, Pari L. Effect of an aqueous extract of Scoparia dulcis on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. ***Brazillian J Med Biol Res*** 37 (2004) 577-586.

[27] Leelavinothan P, Munia PL. Protective Role of Scaporia Dulcis Plant Extract on Brain Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in STZ Diabetic Male Wistar Rats. ***BMC Complementrary and Alternative Medicine*** (2004) 4-16. (B-18)

[28] Liu HR, Tang XY, Dai DZ, Dai Y. Ethanol extracts of Rehmannia complex (Di Huang) containing no corni fructus improve early diabetic nephropathy by combining suppression on the ET-ROS axis with modulate hypoglycemic effect in rats. ***J Ethnopharmacol*** 118 (2008) 466-72.

[29] Maritim A.C, Sandres R.A., Watkins J.B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, ***J Biochem Mol Toxicol*** 17 (2003) 24e39.

[30] Marr G, Cotronre P, Pitocco D, Manto A, Dileo MA, Ruotolo V, Caputo S, Girardina B, Ghirlanda G, Santini SA. Early increase of oxidative stress and redused antioxidant defenses in patients with uncomplicated type 1 diabetes: acase for gender difference. ***Diabetes Care*** 25 (2002) 370-375.

[31] Miller A, Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage, ***Alt Med Rev*** 1 (1996) 103-111.

[32] Ramesh B, Pugalendi KV. Impact of umbelliferone (7-hydroxycoumarin) on hepatic marker enzymes in streptozotocin diabetic rats. ***Indian J Pharmacol*** 38 (2006) 209-10.

[33] Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective antioxidant defenses andenhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM, ***Diabetes*** 46 (1997) 1853-8.

[34] Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ, Impaired antioxidant statusin diabetic rat liver. Effect of vanadate, ***Biochem Pharmacol*** 45 (1993) 539-542.

[35] Searle AJ, Wilson RL. Glutathione Peroxide effect on superoxide, hydroxyl and bromine free radicals on enzyme activity. ***Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*** 37 (1980) 213-217.

[36] Shao J, Qiao L, Janssen R.C, Pagliassotti M, Friedman J.E. Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose production via

elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio, ***Diabetes*** 54 (2005) 976-84.

[37] Stark G. Functional consequences of membrane damage, ***J Membr Biol*** 205 (2005) 1-16.

[38] Stevens MJ. Redox-based mechanisms in diabetes, ***Antioxid Redox Signal*** 7 (2005) 1483-5.

[39] Tatsuki R, Saton K, Yamamoto A, Katsuji K, Ichihara K. Lipid Peroxidation in the Pancreas and Other Organs in STZ Rats. ***Jpn J Pharmacol*** 75 (1997) 267-273.

[40] Tugba H, Fugen A, Asli C, Cemin K. Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. ***Cell Biochem Funct*** 20 (2002) 297-302.

[41] Ugochukwu NH, Bagayoko ND, Antwi ME. The Effects of Dietary Caloric Restriction on Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Mild and Severe Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. ***Clin Chim Acta*** 384 (2004) 121-129.

[42] Vestra MD, Fioretto P. Diabetic nephropathy: renal structural studies in type 1 nd type 2 diabetic patients. ***Internatrional Congress Series*** 1253 (2003) 163-9.

[43] Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-Induced diabetic models in mice and rats, ***Curr Protoc Pharmacol*** (2008) Unit 5.47.