©2017 ASP Ins., *Afarand Scholarly Publishing Institute, Iran*
ISSN: 2252-0805 *Horizon of Medical Sciences 2017;23(1):93-98*

Effect of Methanolic Extract of *Silybum marianum* Seed on the Levels of Glucose, Oxidative Indicators and Biochemical Factors in the Serum of Male Diabetic Wistar Rats

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Nobahari M.[1] *MSc,*
Shahanipour K.* *PhD*

How to cite this article
Nobahari M, Shahanipour K. Effect of Methanolic Extract of *Silybum marianum* Seed on the Levels of Glucose, Oxidative Indicators and Biochemical Factors in the Serum of Male Diabetic Wistar Rats. Horizon of Medical Sciences. 2017;23(1):93-98.

ABSTRACT

Aims As a metabolic disorder, the diabetes increases the oxidative stress, while it reduces the anti-oxidant defense system. The aim of the study was to determine the effects of the methanol extract of *Silybum marianum* on the glucose level, the oxidative indices, and the biochemical factors in the diabetic rats.

Materials & Methods In the experimental study, 24 male and white Wistar rats were studied. The rats were randomly divided into four 6-rat groups including healthy control (negative control), diabetic control without any extract treatment (positive control), and two diabetic groups treating by 150 and 100mg/kg methanol extract respectively. The diabetes was induced by 60mg/kg one-dose streptozotocin as intra-peritoneal injection. The diabetes symptoms having been observed, 4-week and daily extract treatment was done as intra-peritoneal injection. Data was analyzed using one-way ANOVA and the repeated measurement tests.

Findings The treatment, done by the methanol extract of the seeds of *Silybum marianum*, reduced weight, the blood glucose level, cholesterol, malondialdehyde, and protein carbonyl, while it increased HDL and the activity level of paraoxonase enzyme, in the treatment groups compared to diabetic control group. In addition, the most effective extract concentration, reducing cholesterol, glucose, protein carbonyl, malondialdehyde and increasing the activity level of paraoxonase enzyme, was 150mg/kg. And the most effective concentration, increasing HDL and weight, was 100mg/kg ($p<0.05$).

Conclusion The injection of methanol extract of the seeds of *Silybum marianum* positively changes the oxidative indices, as well as the biochemical factors, in the diabetic rats.

Keywords Oxidative Indicators; Diabetes Mellitus; Cholesterol; *Silybum marianum*

CITATION LINKS

[1] Diabetes mellitus: Complication and ... [2] The global burden: Diabetes and impaired glucose ... [3] Approaches to the treatment of ... [4] Aging and oxidative ... [5] Oxidative stress, nitric oxide, and ... [6] Exercise training and antioxidant: Effects on ... [7] Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats ... [8] Oxidative protein damage is associated with ... [9] The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: From molecular mechanism to clinical ... [10] Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive ... [11] The efficacy of Silybummarianum (L.)Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical ... [12] Silymarin, the antioxidant component of silybummarianum, protects against burn-induced oxidative skin ... [13] Stimulatory effect of silibinin on DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: Non-response in hepatoma and other malign cell ... [14] Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of ... [15] The many faces of Silybummarianum(Milk Thistle): Part 1 - treating cancer and hyperlipidemia and restoring kidney ... [16] Effect of Silymarin and and its ... [17] Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia ... [18] Oxidative damage to protein: Spectrophotometric method for carbonyl ... [19] Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induce oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic ... [20] ilymarin increases antioxidant enzymes ... [21] Anti-Stroidogenic activity of ... [22] Silymarin as a potential hyper cholesterolacmic ... [23] Effect of soy protein and genistein on ... [24] Biochemical evaluation of oxidative stress in type ... [25] Biochemical evaluation of oxidative stress in type ... [26] Effect of hydrolcoholic extract of Aloe vera and ... [27] Lipid peroxidation and resistance to oxidation in ... [28] Altered kinetic attributes of ...

*Biochemistry Department, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
[1]Biochemistry Department, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

Correspondence
Address: Department of Biochemistry, Islamic Azad University, Kamarbandi Street, Falavarjan, Isfahan, Iran
Phone: +98 (31) 37420140
Fax: +98 (31) 37420136
shahanipour_k@yahoo.com

Article History
Received: January 23, 2016
Accepted: July 19, 2016
ePublished: January 19, 2017

Copyright© 2017 ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

اثر عصاره متانولی بذر خارمریم بر میزان گلوکز، شاخص‌های اکسایشی و فاکتورهای بیوشیمیایی در سرم موش‌های صحرایی دیابتی نر ویستار

معصومه نوبهاری MSc
گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
کهین شاهانی‌پور* PhD
گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

چکیده
اهداف: دیابت یک اختلال متابولیک است که منجر به افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. هدف مطالعه حاضر، تعیین اثرات عصاره متانولی بذر خارمریم بر سطح گلوکز، شاخص‌های اکسیداتیو و فاکتورهای بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی دیابتی بود.
مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه ۶تایی؛ کنترل سالم (کنترل‌منفی)، کنترل دیابتی بدون تیمار با عصاره (کنترل‌مثبت) و دو گروه دیابتی تحت تیمار با دو دوز ۱۵۰ و ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره متانولی تقسیم شدند. القای دیابت با استفاده از داروی استرپتوزوتوسین به‌صورت تک‌دوز و داخل‌صفاقی به‌میزان ۶۰میلی‌گرم بر کیلوگرم صورت گرفت و پس از مشاهده علایم دیابت تیماره عصاره‌ها به‌مدت ۴ هفته به‌صورت روزانه و داخل‌صفاقی انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون اندازه‌گیری مکرر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.
یافته‌ها: تیمار با عصاره متانولی بذر خارمریم سبب کاهش وزن، سطح گلوکز خون، کلسترول، مالون‌دی‌آلدئید و پروتئین کربونیل و افزایش میزان HDL و فعالیت آنزیم پاراکسوناز در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل دیابتی شد که موثرترین غلظت عصاره در کاهش کلسترول، گلوکز، پروتئین کربونیل، مالون‌دی‌آلدئید و افزایش فعالیت آنزیم پاراکسوناز ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم و موثرترین غلظت در افزایش HDL و وزن ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم بود ($p<0/05$).
نتیجه‌گیری: تزریق عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم سبب ایجاد تغییرات مثبت در شاخص‌های اکسیداتیو و فاکتورهای بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود.
کلیدواژه‌ها: شاخص‌های اکسایشی، دیابت، کلسترول، خارمریم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۲۹
*نویسنده مسئول: shahanipour_k@yahoo.com

مقدمه

دیابت یک بیماری نیست، بلکه به گروهی از بیماری‌های متابولیک اطلاق می‌شود که با بالابودن گلوکز خون ناشی از هر گونه نقص در ترشح انسولین، عمل انسولین یا هر دو مشخص می‌شوند. هیپرگلیسمی مزمن در دیابت با آسیب، اختلال و ازکارافتادن اندام‌های گوناگون به‌خصوص چشم، کلیه، اعصاب و قلب و عروق همراه است[1].

بر طبق گزارش‌های سازمان جهانی بهداشت و فدراسیون بین‌المللی دیابت، دیابت یک اپیدمی است و برای بهداشت عموم در جهان خطر عمده‌ای بوده و وضعیت آن به‌سرعت در حال بدترشدن است. تخمین زده می‌شود ۶/۵% جمعیت ۲۰ تا ۷۹ساله جهان یعنی ۲۸۵میلیون نفر به دیابت آشکار مبتلا هستند و در سال ۲۰۳۰ حداقل ۴۳۹میلیون نفر به آن مبتلا خواهند بود[2]. از نظر بالینی، حتی در زمان تشخیص، بیماری دیابت به‌میزان زیادی پیشرفت کرده است که این امر اهمیت کنترل رژیم غذایی و لزوم استفاده از درمان و اقدامات پیشگیری‌کننده را به‌خوبی مشخص می‌نماید. با توجه به اینکه امکان تغییر برخی ریسک‌فاکتورها شامل جنسیت، سن و سابقه فامیلی عملاً وجود ندارد، لذا تغییردادن سایر ریسک‌فاکتورها از طریق مصرف غذاهای کم‌چرب، کم‌کالری و سودمند، از اهمیت بالینی زیادی برخوردار است[3].

استرس اکسیداتیو در نتیجه عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن از یک سو و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از سوی دیگر ایجاد می‌شود[4]. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که افزایش قند خون با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است که خود، بسیاری از عوارض بیماری را به‌دنبال دارد[5]. تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن، نقش مهمی در ایجاد این عوارض دارد. همچنین رادیکال‌های آزاد موجب آسیب به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شوند یا از ترمیم آنها جلوگیری می‌کنند[6].

اکسیداسیون LDL (لیپوپروتئین با چگالی پایین) از دیگر عوارض افزایش رادیکال‌های آزاد است که به‌عنوان یک مرحله کلیدی برای شروع روند آترواسکلروز شناخته شده است. پاراکسوناز (PON-1) یک آنزیم استراز است که همراه با HDL-C (کلسترول لیپوپروتئین با چگالی بالا) حمل می‌شود. آنزیم پاراکسوناز از پراکسیداسیون LDL جلوگیری می‌کند و بنابراین در کاهش ریسک آترواسکلروز نقش دارد[7]. از نظر بیوشیمیایی از جمله شاخص‌های مخرب استرس اکسیداتیو، افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و پروتئین کربونیل و کاهش فعالیت آنزیم پاراکسوناز است[8, 9]. از پیامدهای فیزیولوژیک اجتناب‌ناپذیر موجودات زنده کربونیلاسیون پروتئین است که اغلب شاخص معتبری برای تغییر اکسایشی پروتئین‌ها است. در بیماری‌های مختلف همانند پیری، التهاب مفاصل و آلزایمر مشتقات کربونیل افزایش می‌یابد[10]. از سوی دیگر کاهش استرس اکسیداتیو با استفاده از مواد موثره گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی از اهمیت زیادی برخوردار است.

تاثیر مثبت عصاره بذر گیاه خارمریم که در درمان بیماری‌های کبدی استفاده می‌شود در کاهش قند خون بالا گزارش شده است[11]. سیلی‌مارین به‌عنوان مهم‌ترین ماده موثره گیاه خارمریم با نام علمی *سیلیبوم ماریانوم* (*Silybum marianum*) است که از فلاوونولیگنان تشکیل شده است[12]. نتایج مطالعات نشان داده‌اند که سیلی‌مارین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است و سبب کاهش رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود[13]. این گیاه، بومی جنوب اروپا و شمال آفریقا است و در مناطق مختلف ایران از جمله البرز مرکزی، خوزستان و آذربایجان رویش دارد[14]. مطالعات نشان داده‌اند که سیلی‌مارین موجب کاهش کلسترول و قند خون می‌شود[15]. بررسی‌ها نشان داده که سیلی‌مارین موجب کاهش جذب کلسترول و به‌دنبال آن سبب کاهش مقادیر کلسترول و LDL خون و افزایش قابل ملاحظه HDL خون می‌شود[16].

هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین اثرات عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم بر سطح گلوکز، شاخص‌های اکسیداتیو و فاکتورهای بیوشیمیایی در موش‌های صحرایی دیابتی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از ۲۴ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰گرم استفاده شد. موش‌های صحرایی آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس؛ کرج؛ ایران) به‌مدت ۴ هفته دسترسی داشتند. برای انجام مطالعه، از آن دسته موش‌های صحرایی نر استفاده شد که در شرایط طبیعی و در حالت ناشتا، میزان گلوکز سرم آنها کمتر از

۱۳۰میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود. برای این منظور یک قطره خون از دم موش صحرایی گرفته شد و میزان گلوکز خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر (ایزی‌گلوکو؛ ایالات متحده) تعیین شد.

بذر گیاه خارمریم از مرکز جهاد کشاورزی اصفهان تهیه شد. بذرها به‌صورت پودر درآمدند و به‌منظور حذف روغن از پودر حاصله توسط کلروفرم دکانته و در دمای پایین‌تر از ۶۰°C خشک شدند. سپس از پودر فاقد چربی توسط متانول۷۰% عصاره‌گیری انجام شد.

موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به چهار گروه ۶تایی؛ کنترل سالم (کنترل‌منفی)، کنترل دیابتی بدون تیمار با عصاره (کنترل‌مثبت) و دو گروه دیابتی تحت تیمار با دو دوز ۱۵۰ و ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره متانولی تقسیم شدند. برای دیابتی‌نمودن موش‌های صحرایی از داروی استرپتوزوتوسین (سیگما؛ ایالات متحده) به‌صورت تک‌دوز و داخل‌صفاقی به‌میزان ۶۰میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده شد و پس از مشاهده علایم دیابت (کاهش وزن، افزایش قند خون به‌میزان بیش از ۳۰۰میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و پرنوشی)، تیماره عصاره‌ها (۳ روز پس از تزریق استرپتوزوتوسین) با سرنگ انسولین به‌مدت ۴ هفته به‌صورت روزانه و داخل‌صفاقی انجام شد. میزان وزن در ابتدا و انتهای مطالعه تعیین شد. همچنین میزان گلوکز سرم نیز در انتهای هر هفته اندازه‌گیری شد.

۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌های صحرایی توسط کتامین بی‌هوش شده و خونگیری از قلب آنها به‌عمل آمد و بعد از جداشدن سرم، فاکتورهای بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه‌گیری کلسترول و HDL سرم با روش آنزیماتیک و با استفاده از کیت (پارس‌آزمون؛ ایران) صورت گرفت. به‌منظور ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، مولکول MDA به‌عنوان شاخصی از لیپیدها آنالیز شد. برای اندازه‌گیری MDA از روش باربیتوریک‌اسید استفاده شد. تحت شرایط اسیدی و دمای ۹۵°C یک مولکول مالون‌دی‌آلدئید با دو مولکول تیوباربیتوریک‌اسید واکنش داده و کمپلکس صورتی‌رنگ ایجاد می‌کند. در ابتدا پروتئین سرم با استفاده از تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) رسوب داده شد و توسط سانتریفیوژ (هرم لز۳۲۰؛ آلمان) جدا شد و محلول صاف‌شده برای اندازه‌گیری MDA مورد استفاده قرار گرفت. با روش اسپکتروفتومتری (بهداد؛ ایران) جذب نوری کمپلکس رنگی در طول موج ۵۳۵نانومتر قرائت شد[17].

به‌منظور اندازه‌گیری پروتئین کربونیل، بعد از رقیق‌سازی سرم، در دو میکروتیوب مجزای سمپل و بلانک، به محتویات اپندورف نمونه DNPH (۲و٤- دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین) (سیگما؛ ایالات متحده) حل‌شده در اسیدکلریدریک دو نرمال اضافه شد. به اپندورف بلانک فقط اسیدکلریدریک دو نرمال اضافه شد. اپندورف‌ها یک ساعت در تاریکی قرار داده شدند. در مرحله بعد تری‌کلرواستیک‌اسید۲۰% (مرک؛ آلمان) به هر دو اپندورف اضافه شد که باعث رسوب پروتئین‌ها می‌شود. سپس پلیت تشکیل‌شده در هر اپندورف سه مرحله سانتریفوژ و با ترکیب اتانول/اتیل‌استات شست‌وشو داده شد. در نهایت با اضافه‌کردن گوانیدیوم‌هیدروکلراید (سیگما؛ آلمان) ۶مولار و قراردادن در انکوباتور (فین‌تک؛ کره جنوبی) ۳۷°C، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۳۷۰نانومتر قرائت شد[18].

فعالیت ارگانوفسفات هیدرولازی یا همان پاراکسونازی آنزیم PON-1 با استفاده از محاسبه سرعت اولیه هیدرولیز سوبسترای پاراکسون (سیگما؛ ایالات متحده) به پارانیتروفنول تعیین می‌شود. به این منظور ابتدا براساس پروتکل *بلتوسکی* (*Beltowski*) محلولی شامل ۱۰۰میلی‌مولار از تریس HCl (اسیدکلریدریک) و ۲میلی‌مولار CaCl2 (کلریدکلسیم) در غلظت نهایی ۲میلی‌مولار پاراکسون تهیه شد و pH آن روی ۸ تنظیم شد (مخلوط سنجش) و در نهایت با اضافه‌کردن ۲۰میکرولیتر از سرم (حاوی آنزیم) به این مخلوط در کووت (در شرایط پایدار) میزان تشکیل پارانیتروفنول در طول موج ۴۱۲نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر مونیتور شد. در پایان با استفاده از فرمول زیر فعالیت سرم پاراکسونازی آنزیم PON-1 بر حسب میکرومول بر سانتی‌متر محاسبه شد[19]:

فعالیت آنزیم پاراکسوناز = A/T.F

$F = (VT/VS)/\varepsilon_{412}$

VT = حجم کل (میکرولیتر)، VS = حجم نمونه (میکرولیتر)، A = تغییر در جذب، T = زمان (دقیقه)، ε_{412} = ضریب خاموشی مولار پاراکسوناز بر مول در سانتی‌متر (۰/۰۱۸۲۹).

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون اندازه‌گیری مکرر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها

استفاده از استرپتوزوتوسین برای القای دیابت باعث افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید، پروتئین کربونیل، کلسترول و گلوکز خون و کاهش فعالیت آنزیم پاراکسوناز و میزان HDL در سرم خون موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم شد ($p<0/05$).

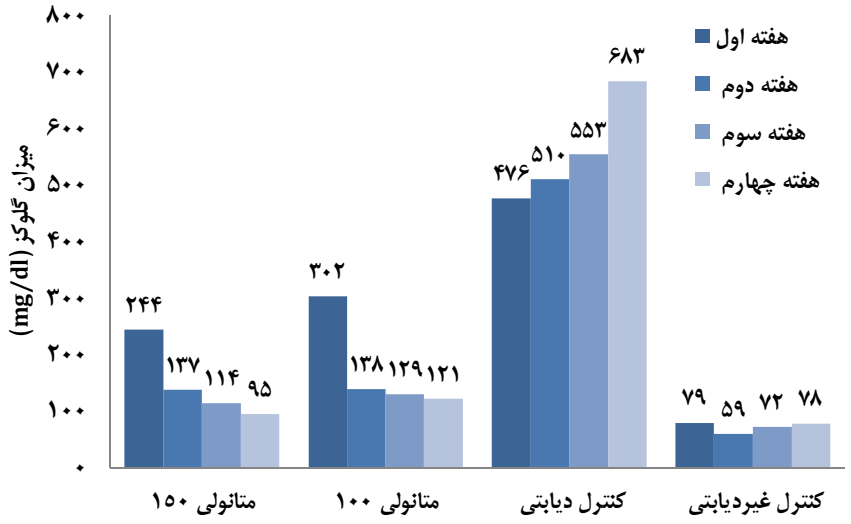
میانگین سطح گلوکز در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره متانولی با غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل‌منفی تفاوت معنی‌دار نشان داد ($p<0/001$؛ نمودار ۱).

در تمام گروه‌ها به‌جز گروه کنترل‌منفی غیردیابتی وزن موش‌های صحرایی در انتهای دوره کاهش یافت ($p<0/001$). گروه کنترل‌منفی غیردیابتی با تمام گروه‌ها تفاوت معنی‌دار نشان داد ($p<0/05$؛ نمودار ۲).

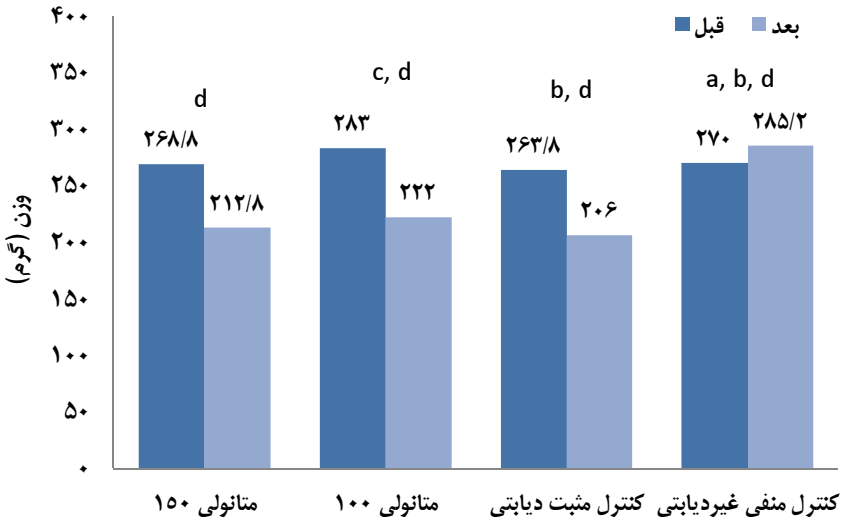
سطح کلسترول سرم، پروتئین کربونیل و آنزیم پاراکسوناز در هر دو گروه دیابتی تحت درمان با عصاره متانولی خارمریم با غلظت ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم (غلظت بالا) و غلظت ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم (غلظت پایین) در مقایسه با گروه کنترل‌مثبت دیابتی تفاوت معنی‌دار نشان داد. در خصوص HDL، تیمار با عصاره متانولی در غلظت بالا با گروه کنترل‌منفی غیردیابتی تفاوت معنی‌دار داشت و گروه تیمار با غلظت پایین با دو گروه کنترل‌مثبت و کنترل‌منفی تفاوت معنی‌دار نشان داد. در مورد مالون‌دی‌آلدئید، گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره متانولی با غلظت بالا با گروه تحت تیمار با غلظت پایین عصاره و گروه کنترل‌مثبت تفاوت معنی‌دار داشت. گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره متانولی با غلظت پایین نیز با تمام گروه‌های دیگر تفاوت معنی‌دار نشان داد ($p<0/05$؛ جدول ۱).

بحث

نتایج این پژوهش حاکی از آن است که عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم به‌دلیل وجود ترکیبات فنلی و به‌ویژه جزء فعال آن یعنی سیلی‌مارین، قند خون موش‌های صحرایی دیابتی را کاهش داد. سیلی‌مارین از تخریب سلول‌های سازنده انسولین جلوگیری می‌کند و سبب بهبود بافت آسیب‌دیده لوزالمعده می‌شود[20]. از طرفی، از طریق تعدیل فعالیت آنزیم‌های کبدی مسئول متابولیزم کربوهیدرات‌ها در جهت کاهش قند خون عمل می‌نماید[15, 20].



نمودار ۱) میانگین سطح گلوکز سرم در گروه‌های مورد مطالعه در چهار هفته متمادی (تفاوت همه گروه‌ها با هم معنی‌دار بود)



نمودار ۲) میانگین وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه در ابتدا و انتهای دوره (a: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه عصاره متانولی ۱۵۰؛ b: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه متانولی ۱۰۰؛ c: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل‌مثبت دیابتی؛ d: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل‌منفی غیردیابتی)

جدول ۱) مقایسه میانگین آماری شاخص‌های بیوشیمیایی در چهار گروه مورد بررسی

گروه ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره	گروه ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره	گروه کنترل‌مثبت دیابتی	گروه کنترل‌منفی غیردیابتی
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)			
٦٦/٤٣±٦/١٩ c	٧٢/١٧±١٢/٥٩ c	١١٠/٠٠±٢٠/٢٧ a,b,d	٦٤/٦٠±١/٨٢ c
HDL (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)			
٣٠/٨٣±٢/٧٩ d	٣٧/٨٠±٤/٨٢ c,d	٢٣/٨٠±٤/٢١ b,d	٥٠/٨٠±١٥/٧٢ a,b,c
پروتئین کربونیل (نانومول بر میلی‌گرم)			
٥/٥٤±٠/٦٠ c	٧/٦١±١/٠٨ c	٢٨/٦١±٤/٣٨ a,b,d	٥/٢٧±٠/٨٨ c
مالون‌دی‌آلدئید (میکرومول بر دسی‌لیتر)			
٠/٢٨٠±٠/٠٢٥ b,c	٠/٤٠٦±٠/٠٣٠ a,c,d	٠/٨٩٨±٠/٠٦٣ a,b,d	٠/٢٦٧±٠/٠٦٧ b,c
آنزیم پاراکسوناز (میکروواحد در لیتر)			
١٦٣/٩٢±١٨/٨٠ c	١٤٢/٣٤±٣٨/٣١ c	١٠١/٧٣±٣٢/٦٥ a,b,d	١٦٨/٢٦±٠٠/٣٩

a: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه عصاره متانولی ۱۵۰؛ b: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه متانولی ۱۰۰؛ c: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل‌مثبت دیابتی؛ d: تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل‌منفی غیردیابتی

نتایج به‌دست‌آمده در رابطه با کلسترول نشان داد که گروه عصاره متانولی با غلظت ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم، کمترین میزان کلسترول را بعد از گروه کنترل‌منفی غیردیابتی داشت و گروه کنترل‌مثبت دیابتی بیشترین میزان کلسترول را به خود اختصاص داد. این نتایج با نتایج تحقیقات دیگران مطابقت دارد[15, 16, 21]. مطالعات آزمایشگاهی حاکی از آن است که سیلی‌مارین موجود در عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم موجب بهبود دفع LDL و کاهش سنتز کلسترول در سلول‌های کبد و همچنین پیشگیری از عوارض ناشی از کلسترول بالا و کاهش تشکیل پلاک آترواسکلروز در موش‌های صحرایی مبتلا به هایپرکلسترولمی می‌شود[22].

بررسی سطح HDL در گروه‌های مورد مطالعه بیانگر کاهش معنی‌دار این متغیر در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه سالم و وجود تفاوت معنی‌دار در مقایسه گروه مداخله دیابتی با گروه کنترل دیابتی بود. کاهش سطح HDL در گروه دیابتی که در نتیجه افزایش سنتز کلسترول درون‌زاد در اثر کمبود انسولین و کاهش توانایی کبد در تولید آپولیپوپروتئین مرتبط با HDL به‌وجود می‌آید، در مطالعه *لی* در سال ۲۰۰۶ نیز گزارش شده است[23].

نتایج حاصل از تاثیر تزریق عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم بر میزان پروتئین کربونیل حاکی از آن است که گروه کنترل‌مثبت دیابتی بیشترین میزان پروتئین کربونیل و گروه دریافت‌کننده عصاره متانولی با غلظت ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم بعد از کنترل غیردیابتی کمترین میزان را به خود اختصاص داد. قند خون بالا در دیابت می‌تواند سطوح گلیکاسیون و آسیب اکسیداتیو پروتئین‌های داخل سلولی و پلاسما را افزایش دهد. اکسیداسیون پروتئین‌ها، نیتروتیروزین و مشتقات پروتئین کربونیل را تولید می‌کند. تشکیل گروه کربونیل، یک نشانگر اولیه و پایدار برای اکسیداسیون پروتئین در بدن در نظر گرفته می‌شود[24].

افزایش سطح پروتئین کربونیل در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین، در برخی تحقیقات گزارش شده است[25] و با نتایج حاصل از تحقیق حاضر همخوانی دارد. مواد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی با ایجاد پایداری در کمپلکس نسخه‌برداری ژن عامل بازساخت سلول‌های بتای پانکراس سبب بازسازی و حفاظت این سلول‌ها در برابر آسیب‌های سیتوتوکسیک استرپتوزوتوسین می‌شوند[26].

براساس نتایج این بررسی، میزان مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری در گروه کنترل‌مثبت دیابتی نسبت به کنترل‌منفی (غیردیابتی) بیشتر بود. ارتباط بالارفتن قند خون با پراکسیداسیون لیپیدها در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است[27]. درمان با عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم موجب کاهش سطح MDA می‌شود. عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم به‌دلیل داشتن سیلی‌مارین که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت‌کنندگی سیستم حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن است، می‌تواند کاهش پراکسیداسیون لیپیدی را به‌دنبال داشته باشد[12] که این خود می‌تواند کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید را در گروه‌های تحت تیمار تا حدی توجیه نماید.

وزن موش‌های صحرایی در این مطالعه در دو زمان ابتدا و انتهای مطالعه اندازه‌گیری شد. میانگین وزن موش‌های صحرایی در گروه‌ها به‌طور معنی‌داری متفاوت بود. در تمام گروه‌ها به‌جز گروه کنترل‌منفی (غیردیابتی) وزن موش‌های صحرایی در انتهای دوره کاهش یافت. کاهش کمتر وزن در گروهای دیابتی تحت تیمار با عصاره خارمریم در این بررسی را می‌توان به اثر هیپوگلیسمیک و ضددیابتی آن نسبت داد[20].

هیپرگلیسمی به تولید گونه‌های فعال اکسیژن منجر می‌شود که این گونه‌های فعال به‌نوبه خود رادیکال‌های هیدروکسیل بیشتری تولید می‌کنند. نتیجه این فرآیند، تسریع پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب‌های غشایی و کاهش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است[28]. در این مطالعه نیز کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پاراکسوناز در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم مشاهده شد. مقایسه فعالیت آنزیم پاراکسوناز در پایان مطالعه بین گروه‌ها نشان داد که این شاخص در گروه کنترل‌مثبت دیابتی کمترین فعالیت و در گروه عصاره متانولی با غلظت ۱۵۰میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، بعد از گروه کنترل‌منفی غیردیابتی بیشترین فعالیت را داشت که کاهش فعالیت این آنزیم در موش‌های صحرایی دیابتی ممکن است به‌علت افزایش پراکسیداسیون لیپید و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که این با نتایج بررسی‌های دیگران مطابقت دارد[9].

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به کمی تعداد موش‌های صحرایی و همچنین به عفونت‌های ایجادشده در آنها اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود طول دوره درمان بیشتر شود و از اسانس این گیاه برای درمان استفاده شود.

در این مطالعه با استفاده از بررسی فاکتورهای اختصاصی اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی نظیر مالون‌دی‌آلدئید، پروتئین کربونیل و فعالیت آنزیم پاراکسوناز مشخص شد که می‌توان با استفاده از عصاره بذر گیاه خارمریم نسبت به تصحیح اثرات منفی دیابت اقدام نمود. با توجه به اینکه گیاهان دارویی نسبت به ترکیبات شیمیایی اثرات جانبی نسبتاً کمتری دارند، می‌توان با انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینه اثر بالینی این عصاره‌ها، از این گیاهان به‌عنوان جایگزین‌های داروهای شیمیایی استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم سبب کاهش سطوح گلوکز خون، کلسترول، مالون‌دی‌آلدئید و پروتئین کربونیل و افزایش میزان HDL و فعالیت آنزیم پاراکسوناز در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود.

تشکر و قدردانی: از کارکنان آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد فلاورجان که نهایت همکاری را در اجرای این پژوهش داشتند کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود. همچنین در کلیه مراحل، قوانین و مقررات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

تعارض منافع: موردی از طرف نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان: معصومه نوبهاری (نویسنده اول) پژوهشگر (۵۰%)؛ کهین شاهانی‌پور (نویسنده دوم) استاد راهنما (۵۰%)

منابع مالی: این مقاله منتج از پایان‌نامه است و منابع مالی شخصی بوده است.

منابع

1- Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: Complication and therapeutics. Med Sci Monti. 2006;12(7):RA130-47.

2- Sicree R, Shaw J, Zimmet P. The global burden: Diabetes and impaired glucose tolerance. IDF Diabetes Atlas 4th edition. 2012;4:1-105.

3- Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatment of diabetes mellitus: An overview. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2003;49(4):635-9.
4- Harman D. Aging and oxidative stress. J Int Fed Clin Chem. 1998;10(1):24-7.
5- Pitocco D, Zaccardi F, Distasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. Rev Diabet Stud. 2010;7(1):15-25.
6- Roshan VD, Assali M, Moghaddam AH, Hosseinzadeh M, Myers J. Exercise training and antioxidant: Effects on rat heart tissue exposed to lead acetate. In J Toxicol. 2011;30(2):190-6.
7- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21(4):473-80.
8- Dayhoff-Brannigan M, Ferrucci L, Sun K, Fried LP, Walston J, Varadhan R, et al. Oxidative protein damage is associated with elevated seruminterleukin-6 levels among older moderately to severely disabled women living in the community. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008;63(2):179-83.
9- Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: From molecular mechanism to clinical implication. Am J Transl Res. 2010;2(3):316-31.
10- Aldini G, Dalle-Donne I, Facino RM, Milzani A, Carini M. Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls. Med Res Rev. 2007;27(6):817-68.
11- Huseini HF, Larijani B, Heshmat R, Fakhrzadeh H, Radjabipour B, Toliat T, et al. The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. Phytother Res. 2006;20(12):1036-9.
12- Hale Z, Tunah T, Erkanh G, Yuksel M, Erkan F, Sener G. Silymarin, the antioxidant component of silybum marianum, protects against burn-induced oxidative skin injury. Burns. 2007;33(7):908-16.
13- Sonnenbichler J, Goldberg M, Hane L, Vogl S, Zelt L. Stimulatory effect of silibinin on DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: Non-response in hepatoma and other malign cell lines. Biochem Pharmacol. 1986;35(3):538-41.
14- Cacho M, Moran M, Corchete P, Fernandez-Tarrago J. Influence of medium composition on the accumulation of flavonolignans in cultured cells of Silybum marianum (L.) Gaertn. Plant Sci. 1999;144(2):63-8.
15- Abascal K, Yarnell E. The many faces of Silybum marianum(Milk Thistle): Part 1 - treating cancer and hyperlipidemia and restoring kidney function. Altern Complement Ther. 2004;9(4):170-5.
16- Sobolova L, Skottova N, Vesera R, Urbanek K. Effect of Silymarin and and its polyphenolic fraction on cholesterol apsorption in rats. Pharmacol Res. 2006;53(2):104-12.
17- Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Cheng YH, Ou HC, Kou JS, et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. Eur J Neuroci. 2002;16(11):2103-12.
18- Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to protein: Spectrophotometric method for carbonyl assay. Methods Enzymol. 1994;233:357-63.
19- Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induce oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. Atherosclerosis. 2003;170(1):21-9.
20- Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez H, Favari L. Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced dibetes in rat pancrease. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2003;136(3):205-12.
21- Gupta M, Mazumder UK, Vamsi ML, Sivakumar T, Kandar CC. Anti-Stroidogenic activity of the two Indian medicinal plants in mice. J Ethnopharmacol. 2004;90(1):21-5.
22- Skottova N, Krecman V. Silymarin as a potential hyper cholesterolacmic drug. Physiol Res. 1998;47(1):1-7.
23- Lee JS. Effect of soy protein and genistein on blood glucose: Antioxidant enzyme activities and lipid profile in stereptozotocin-induce diabetic rat. Life Sci. 2006;79(16):1578-84.
24- McGrowder DA, Anderson-Jackson L, Crawford TV. Biochemical evaluation of oxidative stress in type 1 diabetes. Rijeka: InTech Open. 2013. pp. 223-49.
25- Camelia CH, Baltaru D, Maier M, Muresam A, Clichicl S. Effects of Quercetin and chronic (training)exercsise on oxidative stress status in animals with Streptozotocin-induced diabetes. Bull UASVM Vet Med. 2013;70(1):31-9.
26- Ayoubi A, Omidi A, Valizadeh R, Mousaei A. Effect of hydrolcoholic extract of Aloe vera and Taeucrium on seum glucose and lipid rofile in streptozotocin diabetic male rats. J Birjand Univ Med Sci. 2013;20(2):144-52. [Persian]
27- Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type2 diabetes mellitus. Tohoku J Exp Med. 2004;203(3):211-8.
28- Naidu M, Katyane S. Altered kinetic attributes of Na(+)+K(+)-ATPase activity in kidney, brain and erythrocyte membranes in alloxan-diabetic rats . Indian J Exp Biol. 1992;30(1):26-32.