فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۳۹-۳۰ (۱۳۸۹)

اثر عصاره برگ گردو (*Juglans regia* L.) بر کاهش قند خون در رت‌های دیابتی شده با آلوکسان

صدیقه عسگری[1*]، پریوش رحیمی[2]، پروین محزونی[3] و نجمه کبیری[2]

۱*- دانشیار، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
پست الکترونیک: s_asgari@crc.mui.ac.ir
۲- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۳- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸٦ تاریخ اصلاح نهایی: شهریور ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۸۸

چکیده

دیابت یک ناهنجاری متابولیکی است که با هیپرگلیسمی ناشی از نقص در ترشح انسولین، عمل انسولین و یا هر دو مشخص می‌شود. گردو (*Juglans regia* L.) در طب سنتی ایران برای درمان دیابت کاربرد داشته است. به‌طوری که در این مطالعه اثر کاهندگی قند خون توسط عصاره برگ گردو در موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق ۱۸ موش صحرایی نر سفید با وزن متوسط ۲۲۰-۱۸۰ گرم به‌طور تصادفی در سه گروه ٦تایی تقسیم شدند: گروه اول (کنترل غیر دیابتی)، گروه دوم (کنترل دیابتی) و گروه سوم (رت‌های دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن). تزریقات به صورت درون صفاقی انجام شد. قبل از خون‌گیری، رت‌ها برای ١٦ ساعت ناشتا بوده و بعد نمونه خون ناشتا در لوله‌های هپارینه جمع‌آوری شد. خون‌گیری از سینوس اوربیتال برای تعیین میزان قند و سایر فاکتورهای خونی انجام گردید. پس از خون‌گیری در پایان دوره آزمایشی، پانکراس رت‌ها از بدن خارج و مقاطع بافتی تهیه و اندازه جزایر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حکایت از تفاوت معنی‌دار قند و هموگلوبین گلیکوزیله در گروه دیابتی تیمار شده با عصاره گردو نسبت به گروه دیابتی داشت (P<۰/۰۵). در بررسی هیستومورفولوژیک جزایر پانکراسی نشان داد که اندازه جزایر در میان گروه‌های آزمایشی متفاوت است. میانگین اندازه جزایر در گروه کنترل دیابتی در مقایسه با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد (p<۰/۰۵). این تحقیق نشان‌داد که استفاده از عصاره گردو می‌تواند بر بازسازی و ترمیم جزایر پانکراسی آسیب‌دیده در رت‌های دیابتی مؤثر باشد. عصاره میزان تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد. به‌طوری که به‌نظر می‌رسد افزایش اندازه جزایر در نتیجه تکثیر سلول‌های باقی مانده در جزایر صورت می‌گیرد که تأثیر این عصاره می‌تواند به دلیل وجود فلاونوئیدها و خواص آنتی‌اکسیدانی آنها باشد.

واژه‌های کلیدی: عصاره، گردو (*Juglans regia* L.)، آلوکسان، دیابت.

مقدمه

دیابت قندی، یکی از شایعترین بیماری‌های دستگاه غدد درون‌ریز بدن محسوب می‌شود که عوارض آن افزایش قند خون، اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌هاست. این بیماری به دلیل عدم جذب سلولی قند خون ناشی از کاهش ترشح انسولین و یا

مقاومت سلول‌های بدن در برابر انسولین ایجاد می‌شود (Nakamura *et al.*, 2006 ؛Li *et al.*, 2004). در حال حاضر درمان اصلی و مؤثر دیابت قندی استفاده از انسولین و داروهای شیمیایی کاهنده قند خون است، اما این ترکیبها دارای عوارض جانبی متعددی هستند. با توجه به این مطلب که گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی اثر جانبی کمتری دارند، بنابراین پژوهشگران بدنبال یافتن ترکیبهای گیاهی برای درمان و یا پیشگیری از این بیماری هستند (Isah *et al.*, 2007). گیاهان بسیار زیادی وجود دارند که در طب سنتی ملل مختلف برای درمان دیابت مورد استفاده قرار می‌گیرند که تأثیر هیپوگلیسمیک بسیاری از آنها مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شده است (Dhandapani *et al.*, 2002؛ Li *et al.*, 2004). در این تحقیق از عصاره برگ گردو با نام علمی (*Juglans regia* L.) از خانواده Juglandaceae استفاده شده است. گردو یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی از برگ‌های آن برای درمان دردهای روماتیسمی، تب، دیابت، بیماری‌های پوستی و از ریشه آن برای درمان دیابت و از گل‌های آن برای درمان مالاریا و دردهای روماتیسمی استفاده می‌شود (زرگری، ۱۳۷۵؛ Erdemoglu *et al.*, 2003). اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها دو گروه عمده ترکیب‌های فنلی موجود در برگ گردو می‌باشند. مهمترین اسیدهای فنلی برگ گردو کافئوئیلکوینیک اسید و کوماروئیلکوینیک اسید می‌باشند. مهمترین فلاونوئیدهای موجود در برگ گردو کوئرستین گالاکتوزید، مشتق‌های کوئرستین پنتوزید، کوئرستین آرابینوزید، کوئرستین گزیلوزید، کوئرستین رامنوزید و مشتق‌های کامپفرول پنتوزید می‌باشند (Pereira *et al.*, 2007؛ Solar *et al.*, 2006). پژوهش‌های انجام شده روی برگ گردو خاصیت آنتی‌باکتریال آن را اثبات نموده است (Namasivayam, 2002). بررسی عصاره الکلی و آبی برگ گردو نشان داده که برگ گردو حاوی الاژیتانین است که دارای خواص ضد سرطانی و ضد التهابی است (Kaumar *et al.*, 2003). تاکنون تحقیقی در مورد اثر هیپوگلیسمیک عصاره برگ گردو گزارش نشده است. عصاره برگ گردو حاوی آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنلی است که می‌تواند در درمان دیابت مؤثر باشد (Fukuda *et al.*, 2004). هدف اصلی تحقیق حاضر بررسی اثر عصاره برگ گردو بر کاهش قند و نیز برخی دیگر از پارامترهای بیوشیمیایی خون رت‌های دیابتی می‌باشد.

مواد و روشها

جمع‌آوری گیاه

برگ‌های گردو در تیرماه سال ۱۳۸٤ از باغهای گردوی منطقه‌ی باغبادران استان اصفهان جمع‌آوری و بعد جنس و گونه‌ی آن توسط خانم قائم‌مقامی از گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان شناسایی شد. نمونه‌ای از این خانواده در هرباریوم این دانشکده با شماره ٤۰۲۱ نگهداری می‌شود.

روش تهیه عصاره

برگ های گردو در سایه خشک و بعد پودر شد؛ ۱۰۰ گرم از پودر بدست آمده درون ارلن یک لیتری ریخته شد و به آن اتانول ۹٦ درصد اضافه گردید، به‌گونه‌ای که سطح پودر را بپوشاند. بعد از ۲٤ ساعت محلول صاف شد و در مرحله بعد به تفاله باقی‌مانده، الکل ۹٦ درصد اضافه و بعد از ۱۲ ساعت صاف شد. محلول‌های صاف شده توسط دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور

در دقیقه تا یک سوم حجم اولیه تغلیظ گردید (Solar *et al.*, 2006؛ Eseyin *et al.*, 2007). به منظور جداسازی پروتئین‌ها، چربی‌ها و کلروفیل، محلول تغلیظ شده سه بار توسط ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم دکانته شد. محلول بدست آمده از آخرین مرحله در اتوکلاو و دمای زیر ۵۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط استریل خشک شد. به این ترتیب بعد از چند روز پودر خشک عصاره آماده گردید و پودر خشک شده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Erdemoglu *et al.*, 2003).

حیوانات آزمایشگاهی

در این بررسی از ۱۸ رت نر سفید در محدوده وزنی ۲۲۰-۱۸۰ گرم از نژاد Wistar (انستیتو پاستور، تهران) استفاده شد. تمام حیوانات در لانه‌ی حیوانات گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان در دمای ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ضمناً حیوانات آزادانه به آب و غذای مخصوص رت دسترسی داشتند. به منظور حصول حالت سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات در لانه به انجام رسید. مدل تجربی دیابت قندی نوع ۱ (دیابت وابسته به انسولین) در رت نر با یک‌بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن ایجاد و از سرم فیزیولوژی به‌عنوان حلال آلوکسان استفاده شد (Ragavan & Krishnakumari, 2006). ملاک دیابتی شدن، افزایش میزان گلوکز خون بین ۳۰۰-۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر است (El-demerdash *et al.*, 2005).

نحوه گروه‌بندی

در این تحقیق ۱۸ رت به صورت تصادفی به ۳ دسته ٦تایی تقسیم شدند.

گروه اول (گروه کنترل غیردیابتی): رت‌های سالم که معادل حجم عصاره تزریقی، سرم فیزیولوژی را هر روز به مدت چهار هفته و به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند. این عمل به منظور یکسان نمودن شوک حاصل از تزریق انجام شد.

گروه دوم (گروه کنترل دیابتی): در این گروه، دو هفته قبل از شروع تیمارها دیابت با یک‌بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن رت ایجاد شد و بعد در طول آزمایش معادل حجم عصاره تزریقی، سرم فیزیولوژی را هر روز به مدت چهار هفته و به صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند. این عمل به منظور یکسان نمودن شوک حاصل از تزریق انجام شد.

گروه سوم: گروه دیابتی که عصاره برگ گردو را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن رت به صورت تزریق داخل صفاقی و به مدت چهار هفته، روزانه دریافت نمودند.

خون‌گیری و آزمایش‌های بیوشیمیایی

از رت‌ها در سه نوبت (قبل از تزریق آلوکسان= نوبت، دو هفته بعد از تزریق آلوکسان= نوبت ۱ و شش هفته بعد از تزریق آلوکسان= نوبت ۲) خون‌گیری بعمل آمد و میزان هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c)، انسولین، قند، کلسترول، LDL، HDL، VLDL و تری‌گلیسرید تعیین گردید. خون‌گیری از طریق سینوس اوربیتال گوشه داخلی چشم رت‌ها و توسط لوله‌های مویینه انجام شد. ١٦ ساعت قبل از انجام هر آزمایش مواد غذایی از دسترس

حیوانات خارج گردید تا قند خون به سطح ثابت و پایدار برسد و فقط آب در اختیار رت‌ها قرار گرفت (El-demerdash *et al.*, 2005؛ Erdemoglu *et al.*, 2003). قند، کلسترول تام، تری‌گلیسرید، LDL-کلسترول و HDL-کلسترول با استفاده از کیت آنزیمی زیست شیمی و توسط دستگاه Automatic Analyzer 902 Hitachi، انسولین توسط کیت Monobind و به روش الایزا و هموگلوبین گلیکوزیله با روش کروماتوگرافی کیت بیوسیستم اندازه‌گیری شد.

بنابراین آزمایش‌ها در آزمایشگاه مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان که تحت نظارت کیفی دانشگاه رافائل بلژیک (St. Rafael University, Department of Epidemiology, Leuven, Belgium) و همچنین تحت نظارت آزمایشگاه North west lipid Metabolism and diabetes Research laboratories, USA می‌باشد، انجام گردید.

آزمایش‌های بافت‌شناسی

پس از آخرین خون‌گیری، رت‌ها به‌وسیله کلروفرم بیهوش و پس از شکافتن قفسه سینه، بخشی از بافت لوزالمعده آنها خارج گردید و با محلول سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد. این نمونه‌ها حداقل ٤٨ ساعت در محلول فرمالین بافری ۱۰٪ قرار گرفتند. پس از ثبوت نمونه‌ها و قالب‌گیری در پارافین، توسط میکروترم برشهایی به ضخامت ٤ میکرون تهیه شد. مقاطع با استفاده از روش هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. اندازه جزایر پانکراسی در هر رت در هر گروه مشخص و نهایتاً میانگین آن برای هر گروه تعیین و مشخص شد (Nagappa *et al.*, 2003).

آنالیز آماری داده‌ها

نتایج به صورت Mean±SD مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. برای بررسی نتایج بیوشیمیایی و هیستولوژی و مقایسه میانگین گروه‌های آزمایشی از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس چند متغیری MANOVA (Multivariate) استفاده شد. به‌طوری که $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی گردید. آنالیز آماری با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS انجام شد.

نتایج

در روش عصاره‌گیری به طریقه خیساندن در الکل از هر ۱۰۰ گرم پودر برگ گردو، ٥/٦٤ گرم پودر خشک عصاره بدست آمد. نتایج آزمایشهای بیوشیمیایی نشان داد که در نوبت صفر، میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشته است (جدولهای ۱ و ۲). در گروه‌های کنترل دیابتی و دیابتی تیمار شده با عصاره گردو میزان قند، کلسترول، VLDL و LDL خون افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در نوبت ۱ در مقایسه با گروه غیر دیابتی داشت. بعلاوه در این گروه‌ها در نوبت ۱ در مقایسه با نوبت صفر افزایش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تمامی فاکتورهای ذکر شده دیده شد. در نوبت ۲ در گروه دیابتی تیمار شده با عصاره گردو میزان این فاکتورها کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی پیدا کرده بود. در این گروه، تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل غیر دیابتی دیده نشد. همچنین در این گروه در مقایسه با نوبت صفر تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدولهای ۱ و ۲). میزان انسولین در گروه‌های کنترل دیابتی و دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو در نوبت ۱ نسبت به گروه کنترل غیر دیابتی کاهش معنی‌داری را نشان داده است. به‌طوری که در نوبت ۲ در گروه دیابتی

تیمار شده با عصاره برگ گردو میزان انسولین افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی داشته است. در این گروه، تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل غیر دیابتی دیده نشد (جدول ۱). هموگلوبین گلیکوزیله در گروه کنترل دیابتی در نوبت ۲ افزایش معنی‌داری را نشان داده است. همچنین در گروه دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو میزان این فاکتور کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی داشته است (جدول ۱). میزان HDL سرمی در نوبت ۱ در گروه‌های کنترل دیابتی و دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو کاهش یافته است، ولی در نوبت ۲ در گروه دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو میزان این فاکتور افزایش یافته و در حد نرمال بود (جدول ۲). میزان تری‌گلیسرید در گروه کنترل دیابتی در نوبت ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری داشته است، به نحوی که در گروه دیابتی تیمار شده با عصاره گردو در نوبت ۱ افزایش دیده شده، اما معنی‌دار نبوده است و در نوبت ۲ نیز کاهش یافته و به حد نرمال رسیده بود (جدول ۲).

نتایج بافت‌شناسی

بررسی هیستومورفولوژیک جزایر لانگرهانس گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه نشان داده که اندازه جزایر در این گروه‌ها متفاوت است. اندازه جزایر در گروه کنترل دیابتی (۰/٤±۰/٦۲) در مقایسه با گروه‌های کنترل غیر دیابتی (۰/۳±۱/٦٤) و دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو (۰/۳±۱/۳۲) تفاوت معنی‌داری را نشان داده اما در گروه کنترل غیر دیابتی نسبت به گروه دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو تفاوت دیده شده اما معنی‌دار نبود (شکلهای ۱ تا ۳ و جدول ۳).

جدول ۱- اثر عصاره برگ گردو بر سطح شاخص‌های دیابتی در رت‌های مورد مطالعه

فاکتور		گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه رت‌ها		
		کنترل غیردیابتی	کنترل دیابتی	دیابتی تیمار شده با عصاره گردو
گلوکز (mg/dl)	نوبت (۰)	۹۵/۵±۱۳/۵۲	۹۸/۵±۱۲/٤۳	۹٦/۰±۱۳/۲۱
	نوبت (۱)	۱۰۱/۲۵±۲٦/۲۲	٤۹۲/٤±۹۵/۵٦#*	۲٤۸±۳۱/۱٤#*
	نوبت (۲)	۹۷/۲۵±۱۲/۷۸	۵۹۹±۸۲/۵٦#**	۹٦/٤±٦/۰۸‡
انسولین (µu/ml)	نوبت (۰)	۱۳/۵۲±۱/۱۲	۱۳/٤±۱/۲٦	۱۳/۱±۱/۱٦
	نوبت (۱)	۱۳/۵۲±۱/۰٦	۵/۲۷±۰/۹۱#*	٦/۲±۱/۰۹#*
	نوبت (۲)	۱۲/۵۵±۱/۳۵	٤/۸٦±۱/٤۱#**	۱۳/٤٦±۲/۹۲‡
هموگلوبین گلیکوزیله پلاسما (٪)	نوبت (۰)	٤/۲۲±۰/۲۲	٤/۲۵±۰/۲۵	٤/۵±۰/۲۷
	نوبت (۱)	٤/۳±۰/۱٦	٤/٤٤±۰/٦۳	٤/۳±۰/۱٦
	نوبت (۲)	٤/۵±۰/۲۱	٦/۹±۱/۷۵#**‡	٤/۲۲±۰/۲۲

p<۰/۰۵ *: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتور در هر گروه در نوبت (۱) در مقایسه با نوبت (۰) می‌باشد.

p<۰/۰۵ **: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتور در هر گروه در نوبت (۲) در مقایسه با نوبت (۰) می‌باشد.

p<۰/۰۵ #: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتور در گروه‌ها نسبت به گروه کنترل غیر دیابتی در یک مقطع زمانی می‌باشد.

p<۰/۰۵ ‡: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتور در هر گروه در نوبت (۲) در مقایسه با نوبت (۱) می‌باشد.

هر ستون انحراف معیار± میانگین (Mean±SD) را نشان می‌دهد.

جدول ۲- اثر عصاره برگ گردو بر سطح لیپیدهای سرمی در رت‌های مورد مطالعه

فاکتور		گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه رت‌ها		
		کنترل غیردیابتی	کنترل دیابتی	دیابتی تیمار شده با عصاره گردو
LDL (mg/dl)	نوبت (۰)	۱۴/۷۵±۲/۵	۱۱/۱۶±۲/۲۲	۱۴/۲۶±۳/۲۲
	نوبت (۱)	۱۵/۰±۱/۸۲	۲۰/۲±۱/۴۸*#	۲۸/۸±۳/۰۳
	نوبت (۲)	۱۶/۲۵±۱/۷۰	۳۳/۰±۳/۳۶#**‡	۲۰±۳/۳۱**‡#
HDL (mg/dl)	نوبت (۰)	۳۷/۲۵±۱/۷۰	۳۷/۵±۱/۸۷	۳۶/۵±۱/۸۷
	نوبت (۱)	۴۰/۲۵±۱۰/۸۷	۳۵/۱۶±۶/۰۸#	۴۴/۸±۵/۶۷
	نوبت (۲)	۴۱/۷۵±۶/۳۹	۳۳/۳۳±۶/۶۵#	۴۳/۴±۵/۲۲
VLDL (mg/dl)	نوبت (۰)	۱۷/۴۵±۳/۵۴	۱۶/۸±۳/۳۲	۱۶/۸±۳/۳۲
	نوبت (۱)	۱۵/۱۵±۳/۰۴	۲۳/۵۶±۱۱/۹۷#*	۱۶/۶۴±۱/۲۵*#
	نوبت (۲)	۱۶/۵۵±۲/۳۴	۳۰/۵±۶/۶‡*#	۱۳/۱۶±۳/۶۴
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	نوبت (۰)	۶۱/۲۵±۶/۲۹	۶۱/۲۵±۶/۱۸	۶۱/۵±۶/۲۸
	نوبت (۱)	۶۲/۵۷±۳/۲۰	۹۱±۱۴/۷۱*#	۹۳/۶±۵/۵۰*#
	نوبت (۲)	۶۴/۵±۵/۱۹	۱۲۷/۵±۲۵‡*#	۷۰/۰±۵/۲۴
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	نوبت (۰)	۸۷/۲۵±۱۷/۷۲	۸۳/۹±۱۶/۵۲	۸۴/۰±۱۶/۶۰
	نوبت (۱)	۸۵/۷۵±۱۵/۲۳	۱۱۷/۸±۵۹/۸۷#*	۸۳/۲±۶/۲۶
	نوبت (۲)	۸۲/۷۵±۱۱/۷۰	۱۵۲/۵±۳۳/۰۴#**‡	۶۵/۸±۱۸/۲۲

p<۰/۰۵ *: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتوردر هر گروه در نوبت (۱) در مقایسه با نوبت (۰) می‌باشد.

p<۰/۰۵ **: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتوردر هر گروه در نوبت (۲) در مقایسه با نوبت (۰) می‌باشد.

p<۰/۰۵ #: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتوردر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل غیردیابتی در یک مقطع زمانی می‌باشد.

p<۰/۰۵ ‡: معنی‌دار بودن اختلاف غلظت هر فاکتور در هر گروه در نوبت (۲) در مقایسه با نوبت (۱) می‌باشد.

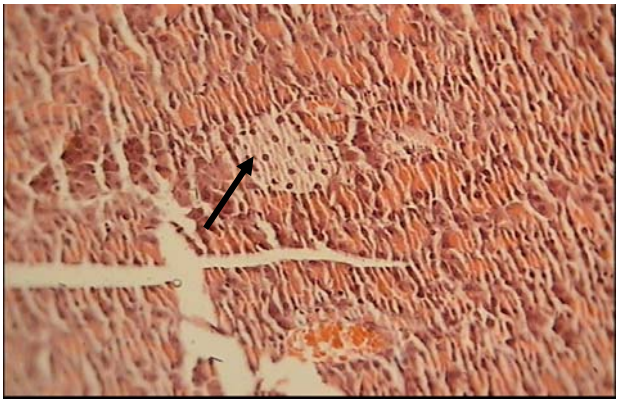
هر ستون انحراف معیار± میانگین (Mean±SD) را نشان می‌دهد.

جدول ۳- مقایسه اندازه جزایر لانگرهانس در رت‌های مورد مطالعه

گروه (تعداد= ۶)	اندازه جزایر لانگرهانس (میکرون)
کنترل غیردیابتی	۱/۶۴±۰/۳
کنترل دیابتی (آلوکسان ۱۲۰ mg/Kg BW i.p)	۰/۶۲±۰/۴#*
دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو (۲۰۰ mg/Kg BW i.p)	۱/۳۲±۰/۳

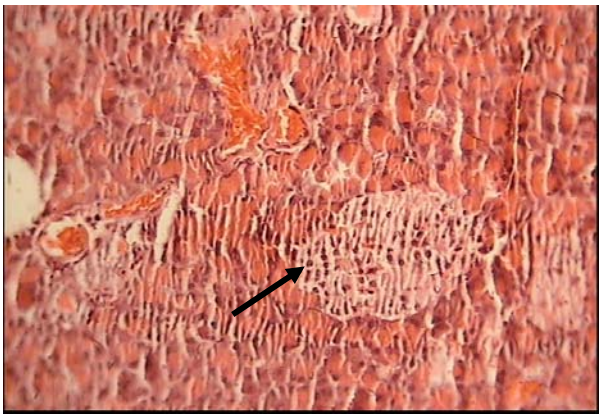
p<۰/۰۵ *: معنی‌دار بودن اختلاف اندازه جزایر لانگرهانس در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل غیردیابتی را نشان می‌دهد.

p<۰/۰۵ #: معنی‌دار بودن اختلاف اندازه جزایر لانگرهانس در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه دیابتی تیمار شده را نشان می‌دهد.



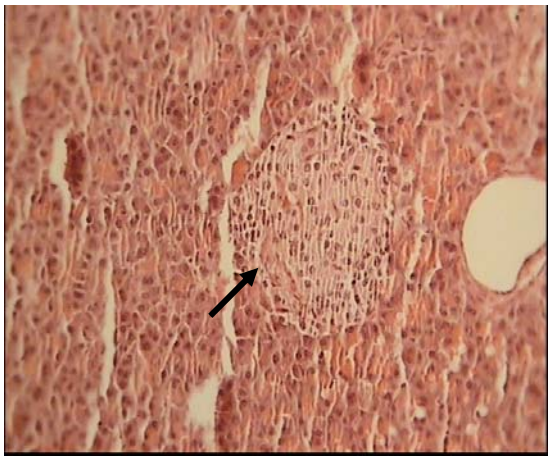
شکل ۱- جزایر لانگرهانس (⟵) در برش عرضی لوزالمعده

گروه کنترل دیابتی (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰X)



شکل ۲- جزایر لانگرهانس (⟵) در برش عرضی لوزالمعده

گروه کنترل غیردیابتی (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰X)



شکل ۳- جزایر لانگرهانس (⟵) در برش عرضی لوزالمعده

گروه دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰X)

بحث

در این تحقیق اثر عصاره برگ گردو بر میزان فاکتورهای سرمی نظیر گلوکز، انسولین، HbAc1، کلسترول تام، تری‌گلیسرید، VLDL، HDL و LDL در شرایط دیابت مورد بررسی قرار گرفت.

با استفاده از ماده شیمیایی آلوکسان منوهیدرات شرایطی مشابه با دیابت نوع ۱ انسانی، به صورت آزمایشگاهی در رت‌ها ایجاد گردید (El-demerdash *et al.*, 2005). سمیت اختصاصی آلوکسان برای سلول‌های بتای پانکراسی، ناشی از جذب سلولی سریع این ماده توسط این سلول‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. طبق تحقیقات انجام شده آسیب اکسیداتیو رادیکال‌های آزاد علت اصلی آسیب سلولی و بافتی در برخی بیماری‌ها نظیر آترواسکلروز، سرطان، دیابت قندی و ... می‌باشد. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که غشاءهای سلولی و ترکیبهای مختلف موجود زنده را در مقابل اکسیدان‌ها حفظ می‌کنند. مکانیسم عمل این ترکیبها جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، واگذاری الکترون به این اکسیدان‌ها و غیرفعال کردن آنها می‌باشد (Vaya & Aviram, 2002). عصاره برگ گردو غنی از ترکیبهای آنتی‌اکسیدان نظیر ترکیبهای فنلی است (Fukuda *et al.*, 2004). اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها دو گروه عمده ترکیبهای فنلی موجود در برگ گردو می‌باشند. مهمترین اسید فنلی برگ گردو کافئوئیلکوینیک اسید و مهمترین فلاونوئید آن کوئرستین می‌باشد (Solar *et al.*, 2006؛ Pereira *et al.*, 2007). نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که در گروه دیابتی تیمار شده با عصاره برگ گردو، سطح قند و HbA1c نسبت به گروه کنترل دیابتی کاهش معنی‌دار و سطح انسولین نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌دار داشته است ($p<0/05$). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که فلاونوئیدها موجب کاهش قند پلاسما می‌شوند (Li *et al.*, 2004). Nuraliev و Avezov (۱۹۹۲)، اثر هیپوگلیسمی کوئرستین را در رت‌های دیابتی شده با آلوکسان گزارش کرده‌اند. براساس نتیجه این تحقیق، کوئرستین علاوه بر قند خون، کلسترول و LDL را به صورت معنی‌داری کاهش می‌دهد (Nuraliev & Avezov, 1992). فلاونوئید کوئرستین جذب گلوکز را در روده مهار می‌کند. این عمل به‌طور اختصاصی بر روی ناقل گلوکز ۲ (GLUT2) صورت می‌گیرد. اسید کلروژنیک بازدارنده اختصاصی آنزیم گلوکز ٦- فسفاتاز بوده و تولید گلوکز را در کبد مهار می‌کند. این آنزیم نقش کلیدی در تنظیم میزان قند خون و خروجی قند از کبد دارد و به این ترتیب باعث کاهش قند خون می‌شود (Namasivayam, 2002). بدنبال کاهش قند خون، میزان هموگلوبین گلیکوزیله نیز کاهش می‌یابد (Dhandapani *et al.*, 2002). کلروژنیک اسید با دخالت غیر مستقیم در سنتز کلسترول و مهار آنزیم هیدروکسی‌متیل‌گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز سنتز آن را در هپاتوسیت‌های کبدی کاهش داده و کلسترول اضافی را از طریق افزایش دفع صفراوی آن کاهش می‌دهد (Solar *et al.*, 2006). به‌طوری که ترکیبهای آنتی‌اکسیدانی گیاهی بر بازسازی و ترمیم سلول‌های بتای لوزالمعده مؤثرند.

بنابراین مطالعه روی سیر، پیاز و شنبلیله نشان داده که در رت‌های دیابتی تیمار شده با آنتی‌اکسیدان، تعداد سلول‌های بتا به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Jelodar *et al.*, 2005؛ El-demerdash *et al.*, 2005). با استناد به نتایج بیوشیمیایی و بافت‌شناسی می‌توان نتیجه‌گرفت که یکی از مکانیسم‌های اثر هیپوگلیسمی

عصاره برگ گردو، بازسازی و ترمیم جزایر لانگرهانس و بدنبال آن افزایش میزان انسولین است. به این ترتیب، در این تحقیق اثر درمانی عصاره برگ گردو در رت‌های دیابتی نشان داده شد.

سپاسگزاری

این پژوهش در قالب طرح شماره‌ی ۸٤۱٤۳ با حمایت مالی معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان انجام شده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، کادر محترم آزمایشگاه مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان جهت انجام آزمایشات بیوشیمیایی و کادر محترم آزمایشگاه بافت‌شناسی دکتر محزونی جهت انجام آزمایشهای بافت‌شناسی قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- زرگری، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. جلد چهارم، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۹۳۲ صفحه.
- Dhandapani, S., Subramanian, V. and Rajagopal, N.N., 2002. Hypolipidemic effect of *Cuminum cyminum* L. on alloxan-induced diabetic rats. Pharmacologial Research, 46(3): 251-255.
- El-demerdash, F.M., Yousef, M.I. and Abou El-Naga, N.I., 2005. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. Food and Chemical Toxicology, 43: 57-63.
- Erdemoglu, N., Kupeli, E. and Yesilada, E., 2003. Anti-inflammatory and antinociceptive assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. Journal of Ethnopharmacology, 89: 123-129.
- Eseyin, O., Ebong, P., Ekpo, A., Igboasiyi, A. and Oforah, E., 2007. Hypoglycemic effect of the seed extract of *Telfairia occidentalis* in rat. Pakistan Journal of Biological Science, 10(3): 498-501.
- Fukuda, T., Ito, H. and Yoshida, T., 2004. Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. Biofactors, 21: 251-253.
- Isah, A.B., Ibrahim, Y.K.E., Abdulrahman, E.M. and Ibrahim, M.A., 2007. The hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Stachytarpheta angustifolia* (Verbanaceae) in normoglycaemic and alloxan-induced diabetic rats. Pakistan Journal of Biological Science, 10(1): 137-141.
- Jelodar, G., Maleki, M., Motadayen, M.H. and Sirus, S., 2005. Effect of fenugreek, onion and garlic on blood glucose and histopathology of pancreas of alloxan-induced diabetic rats. Indian Journal of Medical Sciences, 59(2): 64-69.
- Kaumar, S., Harkonen, P.L., Arora, S. and Kaur, M., 2003. Studies on correlation of antimutagenic and antiproliferative activities of *Juglans regia* L. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology, 22(1): 59-67.
- Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J. and De Kimpe, N., 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitud. Journal of Ethnopharmacology, 92: 1-21.
- Nagappa, A.N., Thakurdesai, P.A., Venkat, N. and Singh, J., 2003. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* L. fruits. Journal of Ethnopharmacology, 88: 45-50.
- Nakamura, U., Iwase, M., Uchizono, Y., Sonoki, K., Sasaki, N., Imoto, H., Goto, D. and Iida, M., 2006. Rapid intracellular acidification and cell death by H2O2 and alloxan in pancreatic ß cells. Free Radical Biology & Medicine, 40: 2047-2055.
- Namasivayam, N., 2002. Hypolipidemic effect of *Cuminum cyminum* L. on alloxan-induced diabetic rats. Pharmacologial Research, 46(3): 251-255.
- Nuraliev, I.N. and Avezov, G.A., 1992. The efficacy of quercetin in alloxan diabetes. EKS Perimentalanaia Klinicheskaia Farmakologia, 55: 42-44.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentao, P., Andrade, P., Ferreira, I., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R. and M.Estevinho, L., 2007. Walnut (*Juglans regia*) leaves: phenolic compound, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food and Chemical Toxicology, 45(11): 2287-2295.
- Ragavan, B. and Krishnakumari, S., 2006. Antidiabetic effect of *T. arjuna* bark extract in alloxan induced diabetic rats. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 21(2): 123-128.
- Solar, A., Colaric, M., Usenik, V. and Stampar, F., 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Plant Science, 453-461.
- Vaya, J. and Aviram, M., 2002. Nutritional antioxidants: mechanism of action, analyses of activities and medical applications. Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents, 1: 99-117.

Hypoglycemic effect of extract of *Juglans regia* L. leaves on alloxan-induced diabetic rats

S. Asgary[1]*, P. Rahimi[2], P. Mahzoni[3] and N. Kabiri[2]

1*- Corresponding author, Basic Sciences Department, Isfahan Cardiovascular Research Center, Applied Physiology Research Center Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, E-mail: s_asgari@crc.mui.ac.ir
2- Department of Biology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran
3- Department of Pathology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Received: March 2008 Revised: September 2009 Accepted: November 2009

Abstract

Diabetes is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, insulin action or both. *Juglans regia* L. (Juglandaceae) has been used in Iranian traditional medicine in diabetes treatment. In this study the blood glucose and lowering effects of hydroalcoholic extract of walnut leaves have been investigated in Wistar rats. In this research 18 white male rats, with 180-220 g weight were randomly allocated into three groups with six rats each group: group 1 (nondiabetic control) group 2 (diabetic control) group 3 (diabetic rats treated with hydro-alcoholic extract of walnut leaves (200 mgkg-1 BW). Before the blood sampling, rats had been fasted for 16h, and then fasting blood samples were collected in tubes with heparin. Sampling was performed from the orbital sinus for estimation of blood glucose and others factors. After the blood sampling at the end of experimental period, pancreatic tissue removed from rat body. Then some sections were made and size of islets was investigated. The results indicated significant reduction in serum glucose and glycosylated haemoglobin levels in the third group ($P<0.05$). Histomorphological investigation of pancreatic islets showed that the size of pancreatic islets is different among the experimental groups. The average of pancreatic islets size indicated significant reduction in diabetic group compared to other groups ($P<0.05$). This research showed that using walnut extract could be effective on regeneration of injured pancreatic islets in diabetic rats. Probably this effect related to antioxidant compounds in extract. It seems that increase in islet size is the result of remainder cells proliferation.

Key words: Extract, walnut (*Juglans regia* L.), alloxan, diabete.