

اثر عصاره آبی دانه Securigera Securidaca بر فعالیت آنزیم کاتالاز گلبول‌های قرمز در موش‌های صحرائی دیابتی تیپ ۱ (عصاره Securigera Securidaca و فعالیت کاتالاز)

اباذر روستازاده* دکتر محسن فیروززای** دکتر محمد شعبانی***

*کارشناس ارشد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

**استاد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

***استادیار بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

زمینه و هدف

عوارض دیابت با استرس اکسیداتیو القا شده به واسطه تولید رادیکال‌های آزاد ارتباط دارد. بدن از طریق مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی چون کاتالاز به مبارزه با آن برمی‌خیزد. در این مطالعه اثر عصاره آبی دانه گیاه Securigera Securidaca بر فعالیت آنزیم کاتالاز گلبول‌های قرمز در موش‌های صحرائی دیابتی تیپ ۱ بررسی شده است.

روش بررسی

در این مطالعه مداخله‌ای از ۳۰ موش صحرائی نر نژاد Wistar استفاده گردید. حیوانات به دو گروه شامل ۱۵ موش صحرائی سالم و ۱۵ موش صحرائی دیابتی گروه‌بندی و دیابتی شدند. موش‌های ناشتا با تزریق یک دوز ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی دیابتی گردیدند. هر گروه نیز به زیرگروه‌های کنترل و آزمایشی تقسیم شدند. پس از دوره تیمار ۳۰ روز در دوزهای ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، خون از قلب آن‌ها جمع‌آوری شد و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گلبول‌های قرمز ارزیابی گردید.

یافته‌ها

نتایج نشان دادند که فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه کنترل دیابتی به طور معناداری ($P=0/002$) کاهش یافته است. به علاوه فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه موش‌های دیابتی که ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/004$) و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P=0/01$) عصاره به آن‌ها تزریق می‌شد در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ($P=0/003$) نشان داد.

نتیجه‌گیری

احتمالاً عصاره آبی دانه گیاه Securigera Securidaca با تغییر فعالیت آنزیم کاتالاز در کاهش عوارض دیابت به واسطه تقویت پاسخ آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرائی دیابتی مؤثر است.

کلید واژه‌ها: کاتالاز، دیابت، استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدانی، گنده تلخه

نویسنده مسئول: استاد بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

آدرس: بزرگراه همت، تقاطع بزرگراه شهید چمران و شیخ فضل‌اله، جنب برج میلاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران-دانشکده پزشکی-گروه بیوشیمی تلفن: ۸۸۰۵۸۷۴۲

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۱۵

Email: mfiroozrai@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۲

مقدمه

استرس اکسیداتیو در انسان ناشی از عدم تعادل وضعیت آنتی اکسیدان هاست (۱). در اغلب موارد استرس اکسیداتیو به صورت تغییر در تعادل پرواکسیدان و آنتی اکسیدان به سمت تشکیل پرواکسیدان تعریف می شود که در نهایت منجر به آسیب بافتی می گردد (۲). چنانچه استرس اکسیداتیو ملایم باشد بافت با افزایش تولید آنتی اکسیدان ها به آن پاسخ می دهد و در صورتی که استرس اکسیداتیو شدید باشد منجر به مرگ سلولی می گردد (۳). شواهدی وجود دارد که نشان می دهد عوارض دیابت با استرس اکسیداتیو القا شده به واسطه تولید رادیکال های آزاد ارتباط دارد (۴). بدن از طریق مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی چون کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون ردوکتازو یا از طریق مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانی غیر آنزیمی به مقابله با این اثرات بر می خیزد. کاتالاز یک هموپروتیین دارای چهار گروه هم است که دارای فعالیت پراکسیدازی است. فعالیت کاتالاز در بافت های پستانداران به طور وسیعی متفاوت است. در کبد و کلیه بیشترین فعالیت و در بافت های همبند کمترین فعالیت را دارد. گلبول های قرمز انسان نیز به طور طبیعی غنی از کاتالاز هستند. هموگلوبین در معرض مقادیر بالایی از اکسیژن قرار دارد. کاتالاز با برداشت بیش از نیمی از H_2O_2 تولید شده در گلبول های قرمز، هموگلوبین را از آسیب اکسیداتیو محافظت می نماید. کمبود کاتالاز با عوارض اکسیداتیو دیابت همراه است. مطالعات نشان داده اند که تقویت سیستم آنتی اکسیدانی عوارض دیابت را کاهش می دهد (۵). تقویت این سیستم باعث بهبود عملکرد اعصاب محیطی، تصحیح عملکرد اندوتلیال در دیابتی ها و اثرات مفیدی بر تجمع پلاکتی می گردد (۶). اخیراً تمایل فزاینده ای به منظور استفاده از داروهای سنتی در درمان بیماری دیابت وجود داشته است (۷). و تحقیقات در زمینه اثربخشی برخی از این داروها مورد تأیید قرار گرفته است (۸). در حال حاضر دانه گیاه *Securidaca Securigera* (گنده تلخه) در کشورهایی

چون هند به عنوان داروی گیاهی کنترل دیابت مورد استفاده قرار می گیرد و عصاره دانه این گیاه دارای خواص دیورتیک، هیپوکالمیک و هیپوگلیسمیک است (۹، ۱۰). هدف از مطالعه کنونی بررسی اثر عصاره آبی دانه این گیاه بر فعالیت آنزیم کاتالاز گلبول های قرمز در موش های صحرایی دیابتی تیپ ۱ بوده است.

روش بررسی

این بررسی از نوع مطالعه مداخله ای_تجربی بود. در این مطالعه از موش های صحرایی نر با نام علمی *Ratus Norvegicus* از نژاد *Wistar* و وارسته *Ratus* با وزن ۲۰۰-۱۸۰ گرم که در حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی ایران نگهداری می شدند استفاده گردید. تمامی موش های صحرایی از شرایط غذایی یکسانی برخوردار بودند و از شرایط روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته استفاده می کردند. در این طرح از ۳۰ موش صحرایی (۱۵ موش صحرایی دیابتی و ۱۵ موش صحرایی سالم) استفاده گردید. جهت دیابتی نمودن موش های صحرایی استرپتوزوتوسین (STZ) خریداری شده از Sigma به صورت تازه در بافر سیترات 10 mmol/L و $\text{pH} = 4.5$ تهیه شد و با دوز ۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم به موش های صحرایی ناشتا (۱۵ موش صحرایی) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. ۴۸ ساعت پس از تزریق STZ موش های صحرایی با دیابت متوسط و گلوکز سرم ۳۰۰-۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر برای آزمایش انتخاب شدند (۱۱). میزان LD_{50} بر اساس روش *Litchfield Wilcoxon* $1/26$ گرم بر کیلوگرم می باشد (۱۲). موش ها به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه ۱: گروه کنترل سالم که ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به آن ها تزریق شد. گروه ۲: گروه موش های سالمی که ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره به آن ها تزریق گردید. گروه ۳: گروه موش های سالمی که ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره به آن ها تزریق شد. گروه ۴: گروه کنترل دیابتی که ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به آن ها تزریق شد. گروه ۵: گروه دیابتی که ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره

یافته‌ها

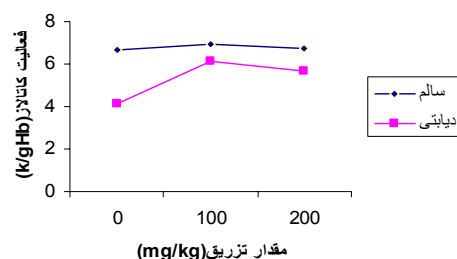
نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سطح فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه سالمی که عصاره دریافت می‌کردند در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (جدول)

جدول: فعالیت آنزیم کاتالاز در گلبول‌های قرمز (k/gHb) در گروه موش‌های مورد مطالعه

مقادیر عصاره تزریق شده (میلی گرم بر کیلوگرم)				
گروه	سالم	۱۰۰	۲۰۰	ارزش *P
سالم	۶/۶۴±۰/۵۷	۶/۹۳±۰/۳۹	۶/۷۲±۰/۷۲	P=NS
دیابتی	۴/۱۲±۰/۴۴	۶/۱۳±۰/۵۴	۵/۷±۰/۴۲	P=۰/۰۰۳
ارزش **P	P=۰/۰۰۲	P=NS	P=NS	

*مقایسه با گروه‌هایی که سالی‌ن دریافت کرده‌اند صورت گرفته است.
**مقایسه میان گروه‌های دیابتی و سالم مربوطه انجام شده است
NS: تفاوت معنی‌دار نیست.

میانگین فعالیت کاتالاز در گروه کنترل دیابتی به‌طور قابل‌توجهی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافته است ($P=۰/۰۰۲$). در این مطالعه نشان داده شد که (آنالیز ANOVA) سطح فعالیت آنزیم در گروه موش‌های دیابتی که عصاره دریافت می‌کردند از گروه کنترل دیابتی بالاتر است ($P=۰/۰۰۳$). میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه موش‌های دیابتی که ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دریافت می‌کردند در مقایسه با گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری وجود دارد (به ترتیب $P=۰/۰۰۴$ و $P=۰/۰۰۱$) (نمودار).



نمودار: میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه موش‌های مورد مطالعه

میانگین فعالیت آنزیم در گروه سالم یعنی زیرگروه‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

در گروه موش‌های دیابتی $P=۰/۰۰۴$ ($P=۰/۰۰۱$) ($P=۰/۰۰۰$)

به آن‌ها تزریق شد. گروه ۶: گروه دیابتی که ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره به آن‌ها تزریق شد. تزریق عصاره در گروه‌های مربوطه صبح‌ها به‌طور روزانه انجام گردید. جهت تهیه عصاره، ۱۰۰ گرم پودر خشک دانه گیاه در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده و سپس به وسیله پارچه صاف شدند. عصاره را به دستگاه Rotary Evaporator برده و پس از تبخیر آب آن، ماده انتهایی جهت خشک شدن کامل به دسیکاتور منتقل گردید (۱۲). طول دوره تیمار هر یک از موش‌ها سی روز بود و تمامی تزریقات از طریق داخل صفاقی انجام گرفت. پس از پایان دوره تیمار و پس از تزریق کتامین به عنوان ماده بیهوش‌کننده، در حالت ناشتا خون در ظروف حاوی ضد انعقاد سیترات سدیم به‌طور مستقیم از قلب موش‌ها جمع‌آوری گردید و به سرعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند و پلاسما و لایه لکوسیتی آن جدا گردید. سپس گلبول‌های قرمز با سرم فیزیولوژی شستشو و تا زمان انجام آزمایشات در فریز -۸۰°C نگهداری شدند.

تعیین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز گلبول قرمز:

روش به کار رفته جهت اندازه‌گیری کاتالاز در گلبول‌های قرمز توسط Aebi (۱۳) بود. در این روش، همولیزیت ذخیره حاوی 5gHb/dl با اضافه کردن آب مقطر تهیه گردید و با بافر فسفات ($\text{PH}=7/4$) به اضافه ۹ حجم $0/15\text{M NaCl}$ رقت $1:500$ از این همولیزیت را تهیه و واکنش با اضافه کردن $0/34$ میلی‌لیتر H_2O_2 (10mM) شروع شد. کاهش جذب در 240 نانومتر محاسبه و میزان فعالیت کاتالاز به صورت k/gHb گزارش گردید.

در این مطالعه مقادیر کمی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. مشخصه‌های بین گروه‌ها با استفاده از آزمون T-test و ANOVA ارزیابی شدند. از نرم‌افزار SPSS13.1 برای آنالیز داده‌ها استفاده شده است. تفاوت‌هایی که مقادیر P کمتر از $0/05$ داشتند معنی‌دار تلقی گردید.

تفاوت معنی‌داری بین گروه سالم و دیابتی که ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دریافت می‌کردند مشاهده نشد.

بحث

افزایش سمیت القا شده به واسطه رادیکال‌های آزاد در بیماران دیابتی (۱۵،۱۴)، و موش‌های صحرایی دیابتی شده با STZ به‌خوبی معلوم شده است (۱۶). گلوکز از طریق اتواکسیداسیون و گلیکاسیون غیر آنزیمی پروتئین‌ها و STZ نیز با تحریک تولید H_2O_2 در محیط *in vitro* و در سلول‌های بتا پانکراس موجب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۱۷). به‌هرحال آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا مانند کاتالاز مسئول سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد آسیب‌رسان هستند. در مطالعه اخیر فعالیت آنزیم کاتالاز گلبول‌های قرمز در موش‌های صحرایی دیابتی کنترل در مقایسه با گروه‌های دیگر به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافته است که این نتایج با مطالعه Leelavinothan و همکارانش (۱۸) که فعالیت کاتالاز در پراکسیداسیون لیپیدها در مغز بررسی نموده است مطابقت داشته و با نتایج مطالعه Kakkar (۱۹)، Soo-Yeul (۲۰) که فعالیت این آنزیم را در کبد مطالعه نموده‌اند و Tatsuki (۲۱) و همکارانشان متفاوت است. این تناقض در نتایج می‌تواند ناشی از اختصاصیت بافتی، تغییرات در شدت دیابت و پراکسیداسیون لیپیدی، طول دوره دیابتی بودن، تغذیه و درمان آن‌ها (۲۲) و یا در شرایط دیگر آزمایش باشد. تغییر در فعالیت کاتالاز که در دیابت ایجاد می‌شود ممکن است پاسخی به افزایش تولید H_2O_2 در این بیماران باشد. مطالعات دیگر که به‌وسیله موادی چون Epicatechin (نوعی فلاونوئید) انجام گرفته است (۲۳) نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی چون کاتالاز

است که این نتایج با مطالعه کنونی در موش‌هایی که عصاره دریافت می‌کردند مطابقت دارد. از آنجایی که مطالعات فیتوشیمیایی نشان داده‌اند (۱۰) عصاره دانه گیاه *Securigera Securidaca* غنی از فلاونوئیدها است لذا احتمال می‌رود که نقش این عصاره در افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی مربوط به‌غنای فلاونوئیدی آن و یا ناشی از اثر مستقیم ترکیبات عصاره بر خود آنزیم کاتالاز و یا بیان ژن آن باشد. ممکن است عصاره این دانه قادر باشد با اثرات سمی القا شده به‌واسطه STZ در سلول‌های بتا مقابله نماید. اگر چه نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره آبی دانه این گیاه احتمالاً به نوعی باعث تغییر فعالیت آنزیم کاتالاز و افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌گردد و می‌تواند مزایای عملی در مقابله با تغییرات پاتولوژیکی که به‌وسیله رادیکال‌های آزاد در دیابت ایجاد می‌شود ایفا نماید، اما مطالعات بیشتری چون جداکردن فراکسیون‌های متعدد این عصاره، مطالعه بیان ژن کاتالاز و مطالعات فیتوشیمیایی مورد نیاز است تا بتوان مکانیسم عمل آن و استفاده آن‌را در کاهش عوارض دیابت ملیتوس نشان داد.

نتیجه‌گیری

احتمالاً عصاره آبی دانه گیاه *Securigera Securidaca* با تغییر فعالیت آنزیم کاتالاز در کاهش عوارض دیابت به‌واسطه تقویت پاسخ آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی مؤثر است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاری پرسنل محترم بخش بیوشیمی و مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تشکر و قدردانی داشته باشند.

References:

1. Antolovic HM, Penzler PD, Patsalides E, Donald S, Robards K. Methods for Testing Antioxidant Activity. *The Analyst*. 2002;127:183-198.
2. Baynes JW. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-412.
3. Halliwell B. Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Curiosity, Case of Consequence. *The Lancet* 1994;344:721-724.
4. Armstrong D, Al-Awadi F. Lipid Peroxidation and Retinopathy in Streptozotocin-Induced Diabetes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:433-6.
5. Wohaieb SA, Godin DV. Alteration in Free Radical Tissue-Defense Mechanisms in Streptozotocin-induced Diabetes in Rats: Effects of Insulin Treatment. *Diabetes* 1987;36:1014-8.
6. Ceriello A new Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a Causal Antioxidant Therapy. *Diabetes Care* 2003;26:1589-96.
7. Kesari AN, Gupta RK, Watal G. Hypoglycemic Effects of *Murraya Koenigii* on Normal and Alloxan Diabetic Rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;97:247-251.
8. Bradley PR. *British Herbal Compendium*, Bournemouth: British Herbal Medicine Association; 1992. p. 73.(vol.1)
9. Porchezani E, Ansari SH. Effect of *Securigera Securidaca* on Blood Glucose Levels of Normal and Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Pharmaceutical Biology* 2001;39:6-64.
10. Ali AA, Mohamed MH, Kamel MS, Fouad MA, Spring D. Studies on *Securigera Securidaca* (L) Deg. et Dorfl. (Fabaceae) Seeds, an Antidiabetic Egyptian Folk Medicine. *Pharmazie* 1998;53:710-715.
11. Siddique O, Sun Y, Lin JC, Chien YW. Facilitated Transdermal Transport of Insulin. *J Pharm Sci* 1987;76:341-345.
12. Hosseinzadeh H, Ramezani M, Danaei AR. Antihyperglycemic Effect and Acute Toxicity of *Securigera Securidaca*-L. Seed Extract in Mice. *Phytother Res* 2002;16:745-747.
13. Aebi H. Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology* 1984;105:121-126.
14. Niskanen LK, Salonen JT, Nyyssonen K, Uusitupa MIJ. Plasma Lipid Peroxidation and Hyperglycaemia: a Connection Through Hyperinsulinaemia. *Diabetes* 1995;12:802-8.
15. Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajadini-Sarmadi J. Relationships between Plasma Measures of Oxidative Stress and Metabolic Control in NIDDM. *Diabetologia* 1997;40:647-53.
16. Haugaard N. Cellular Mechanisms of Oxygen Toxicity. *Physiol Rev* 1968;48:311-73.
17. Takasu N, Komiya I, Asasa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozotocin and Alloxan Induced H₂O₂ Generation and DNA Fragmentation in Pancreatic Islets. *Diabetes* 1991;40:1141-5.
18. 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 Complementary and Alternative Medicine* 2004;4-16.
19. Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid Peroxidation and Activity of Antioxidant Enzymes in Diabetic Rats. *Mol Cell Biochem* 1995;151:113-9.
20. Soo-Yeul C, Ji-Yeun P, Eun-Mi P. Alteration of Hepatic Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Profile in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by Supplementation of Dandelion Water Extract. *Clinica Chimica Acta* 2002;317:109-117.
21. Tatsuki R, Saton K, Yamamoto A, Katsuji K, Ichihara K. Lipid Peroxidation in the Pancreas and Other Organs in STZ Rats. *Jpn J Pharmacol* 1997;75:267-273.
22. Ngozi H, Ugochukwu, Namory D, Bagayoko, Mary E, Antiwi. The Effects of Dietary Caloric Restriction on Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Mild and Severe Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Clinica Chimica Acta* 2004;384:121-129.
23. Sabarimuthu DQ, Pamakanthan SR. Effect of Epicatechin, a Flavonoid on Lipid Peroxidation and Antioxidants in STZ-Induced Diabetic Rat Liver, Kidney and Heart. *Pharmacological Reports* 2005;57:610-615.

Effect of Aqueous Seed Extract of Securigera Securidaca on Erythrocytes Catalase Activity in Type 1 Diabetic Rats

A. Roostazadeh MSc* M. Firoozrai PhD** M. Shabani PhD***

* Master of Science of Biochemistry, Iran University of Medical Sciences

** Professor of Biochemistry, Iran University of Medical Sciences

*** Assistant Professor of Biochemistry, Iran University of Medical Sciences

Background and objective

Complications in diabetes mellitus are associated with free radicals and oxidative stress. The human body prevents these complications through antioxidant defense mechanisms. The aim of the study was to investigate the effect of aqueous seed extract of *Securigera Securidaca* on erythrocyte catalase activity in type1 diabetic rats.

Methods

At the present interventional study thirty male wistar rats were used. Animals were divided to two groups including normal and diabetic (n=15 per each group). Each group was divided further to control and experimental subgroups. The experimental subgroups were received 100 and 200 mg/kg/day of the plant extract intraperitoneally. After thirty days administration, blood sample was directly collected from the heart and erythrocyte catalase activity was assessed.

Results

catalase activity decreased in diabetic control group significantly (P=0.002). Furthermore, catalase activity in groups treated at two doses of 100mg/kg and 200mg/kg was significantly different as compared to control group(P=0.003).

Conclusion

The aqueous seed extract of *Securigera Securidaca* probably could be effective in decreasing diabetic complications through improvement of antioxidant response by altering catalase activity and consequently reducing oxidative stress.

Keywords: Catalase; Diabetes Mellitus, Type1; Oxidative Stress; Antioxidant *Securigera Securidaca*

Corresponding Author: Professor of Biochemistry, Iran University of Medical Sciences

Email :mfiroozrai @yahoo .com