

بررسی اثرات بیولوژیک یک فراورده‌ی طبیعی تهیه شده از گیاه چغندر قند (*Beta vulgaris* subsp. *Cicla*) به عنوان مواد زاید جامد کشاورزی در موش‌های دیابتی

محمد ملکوتیان^۱، میلاد مولودی زرگری^{۲،۳}، محمدحسین اصغری^۴، حسین جعفری منصوریان^{۱،۵،۶*}

- ۱- مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
 - ۲- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 - ۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه، ارومیه، ایران
 - ۴- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران
 - ۵- دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 - ۶- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان، ایران
- * آدرس مکاتبه: کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده بهداشت، گروه مهندسی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط
تلفن: ۳۱۳۲۵۰۷۴ (۰۳۴)، نمابر: ۳۱۳۲۵۱۰۵ (۰۳۴)
پست الکترونیک: h.mansoorian@yahoo.com

تاریخ تصویب: ۹۵/۱۰/۱

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۸

چکیده

مقدمه: دیابت تیپ ۱، یک بیماری مزمن با واسطه‌ی سیستم ایمنی می‌باشد که شیوع آن در دو دهه گذشته به طور چشمگیری افزایش یافته است.

هدف: هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تجویز خوراکی عصاره‌ی آبی برگ گیاه چغندر قند به عنوان مواد زاید جامد کشاورزی بر روی سیمای ایمونولوژیک در موش‌های دیابتی شده توسط STZ بود.

روش بررسی: در این مطالعه، تعداد ۲۰ موش نر نژاد خالص C57 BL/6 با محدودی سنی ۸-۶ هفته در ۴ گروه ۵ تایی (گروه کنترل، دیابتی، درمانی و پیش درمانی) قرار گرفتند. در گروه‌های دوم، سوم و چهارم به کمک پنج تزریق متوالی، روزانه ۵ mg/kg STZ ۴۰ دیابت القا شد. قند خون ناشتای موش‌ها به صورت هفتگی ثبت می‌شد. در پایان دوره مطالعه، موش‌ها آسان کشی شده و پس از برداشت طحال و کشت سلول‌های آن، جهت بررسی میزان تکثیر لنفوسیتی و شدت انفجار تنفسی مورد آزمایش قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد که تجویز عصاره‌ی برگ گیاه چغندر به طور معنی‌داری باعث کاهش قند خون در موش‌های دیابتی می‌شود ($P < 0/05$). میزان تکثیر لنفوسیتی در گروه‌های درمانی و پیش درمانی نسبت به گروه دیابتی کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$). همچنین، تجویز عصاره، به طور معنی‌داری باعث برگرداندن شدت انفجار تنفسی کاهش یافته ناشی از تزریق STZ به میزانی نزدیک به گروه کنترل در گروه‌های درمانی و پیش درمانی شد ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های حاصل از مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره‌ی برگ گیاه چغندر قند اثرات مثبتی در کاهش عوارض و تغییرات ایمونولوژیک مدل دیابت خود ایمن در موش دارد.

کل واژگان: چغندر قند، استرپتوزوتوسین، دیابتخودایمن، تکثیر لنفوسیتی



مقدمه

دیابت تیپ ۱ (Type 1 Diabetes=T1D)، یک بیماری مزمن خودایمن است که با نفوذ سلول‌های ایمنی به جزایر پانکراس و تخریب سلول‌های بتای تولید کننده انسولین مشخص می‌شود [۱]. شیوع دیابت تیپ ۱ در دو دهه‌ی گذشته به طور چشمگیری در سراسر جهان افزایش داشته است. آخرین مطالعات آماری که در این زمینه به دست آمده نشان می‌دهد که بیش از ۲۳۰ میلیون نفر در سراسر دنیا از این بیماری رنج می‌برند و پیش‌بینی می‌شود که این تعداد در سال ۲۰۲۵ به ۳۷۰ میلیون نفر برسد. گزارش‌های این بیماری در ایران نشان از شیوع ۱/۲ الی ۱۴/۵ درصدی این بیماری دارد [۲]. جهت درمان و یا کنترل بیماری دیابت روش‌های درمانی مختلفی مانند استفاده از داروهای طبیعی به عنوان مداخله‌گرهای کاهش دهنده قند و چربی خون مبتلایان به دیابت مورد بررسی قرار گرفتند. برای مثال، عصاره سیب‌زمینی هندی، گل ختمی چینی، صبر زرد و شوید موجب کاهش میزان کلسترول تام و تری‌گلیسیرید سرم و همچنین بهبود حساسیت انسولینی موش‌های صحرایی نر دیابتی می‌شود [۳، ۴]. در این مطالعه محققین برای اولین بار از عصاره برگ گیاه چغندر قند به عنوان مواد زاید جامد کشاورزی جهت یافتن دارویی ارزان قیمت با اثرات جانبی کم برای درمان و بهبود دیابت خود ایمن استفاده نمودند.

چغندر قند (*Beta vulgaris* subsp. *Cicla*) که تحت عنوان Chard نیز شناخته می‌شود، گیاهی از خانواده‌ی Amaranthacea با برگ‌های سبز می‌باشد که به فراوانی در سراسر جهان به مصرف می‌رسد. این گیاه در طب سنتی کشور همسایه‌ی ترکیه به عنوان کاهنده‌ی قند خون مورد استفاده بوده است [۵، ۶]. اثرات هایپوگلیسمیک این گیاه در طی مطالعات تجربی پیشین نیز به اثبات رسیده است [۷]. مهم‌ترین ترکیبات موجود در گیاه چغندر قند betalain ها می‌باشند که betanin به تنهایی ۷۵-۷۸ درصد آنها را به خود اختصاص می‌دهد. این ترکیبات رنگی دارای اثرات درمانی متنوعی از جمله اثرات ضدتوموری، ضدنفخ، اثرات قلبی عروقی، آنتی‌اکسیدانسی و غیره می‌باشند [۵، ۸]. هدف از این مطالعه در این کار تحقیقاتی

اثرات تجویز عصاره آبی برگ گیاه چغندر بر روی سیمایمونولوژیک دیابت تجربی خود ایمن در موش‌های C57 BL/6 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات و گروه بندی

جامعه‌ی مورد مطالعه شامل موش‌های نر نژاد خالص C57BL/6 با محدوده‌ی سنی ۶ تا ۸ هفته (وزن ۲۰-۱۵ گرم) بودند که از انیستیتو پاستور ایران خریداری شدند و به صورت تصادفی به چهار تقسیم شده و در هر گروه ۵ عدد موش قرار گرفت. گروه A شامل موش‌های سالمی بودند که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند (Control). گروه B شامل موش‌های دیابتی بودند که تنها بیماری دیابت در آنها القاء شده بود. جهت القای دیابت، ۵ تزریق متوالی (STZ Streptozotocin، شرکت Sigma، آلمان) به مدت ۵ روز، روزانه ۴۰ mg/kg [۹، ۱۰] در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر بافر سیترات به صورت داخل صفاقی انجام شد (STZ). گروه C شامل موش‌هایی بودند که همزمان با شروع القای بیماری شروع به دریافت عصاره‌ی آبی برگ چغندر قند نمودند (Pre-Treatment). گروه D شامل موش‌هایی بودند که ۲۴ ساعت بعد از دریافت آخرین دوز STZ و تأیید دیابتی شدن آنها، عصاره‌ی آبی برگ گیاه چغندر قند به صورت نامحدود در دسترس آنها قرار گرفت. (Treatment). هر گروه از موش‌ها در قفس‌های مجزا و تمیز در اتاقی با دمای بین ۲۵ - ۲۱ سانتی‌گراد و سیکل شبانه روزی استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با تهویه‌ی مناسب و یک پنجره‌ی بزرگ نورگیر در اتاقی ساکت و مجزا نگهداری می‌شدند و به مقدار نامحدود به آب و غذا دسترسی داشتند و بعد از یک هفته نگهداری جهت تطابق با شرایط محیطی به طور تصادفی در گروه‌های مربوطه قرار داده شدند. تیمارها به مدت چهار هفته از زمان تأیید دیابتی شدن ادامه یافت و در نهایت موش‌ها آسان‌کشی شدند.



عصاره گیری

جهت عصاره گیری، بر اساس روش بولکنت (Bolkent) و همکاران (۲۰۰۰) صورت گرفت با این تفاوت که در طی عصاره گیری جهت جلوگیری از غیرفعال شدن احتمالی مواد مؤثره گیاه، جوشانده نشد [۱۱]. جهت عصاره گیری، برگ گیاه چغندر قند تهیه و روی یک پارچه تمیز پهن شده، به مدت ۸ روز در سایه خشکانده و سپس به شکل پودر در آورده شد. در مرحله ی بعد، ۲۵۰ گرم پودر برگ چغندر قند در ۲ لیتر آب دیونیزه حل شده و در یک ارلن ۲ لیتری نگهداری شد. درب ظرف با چوب پنبه و پارافین محکم بسته شده و به مدت ۵ روز دور از تابش نور خورشید نگهداری شد. در این فاصله محتویات داخل ظرف هر چند ساعت یک بار همزده می شد. بعد از گذشت ۵ روز و پس از صاف کردن های متعدد، مخلوط حاصل به اتاق روتاری انتقال داده شده و به کمک دستگاه روتاری در محیطی با مکش منفی کاملاً آگیری شد. این عمل تا زمان رسیدن به قوامی مشابه عسل ادامه داشت. در نهایت، عصاره ی آگیری شده از ظرف برداشت شده و در ظرفی جدا در دمای ۴ درجه سانتی گراد در یخچال نگهداری شد [۱۲].

القای دیابت

قبل از تجویز هر دز STZ، موش ها به مدت ۴ ساعت در شرایط ناشتا نگهداری می شدند (تمامی گروه ها) و همزمان بستر آنها هم جمع آوری می شد؛ سپس STZ را به صورت داخل صفاقی تا ۵ روز متوالی دریافت می کردند [۱۰، ۹].

اندازه گیری قند خون ناشتا

به منظور اندازه گیری قند خون، بعد از مقید کردن حیوانات از ورید دمی آنها اقدام به خون گیری نموده و سپس توسط دستگاه خودکار گلوکومتر (Glucometer Arkray, Japan) میزان قند خون آنها در روزهای ۰ (قبل از تزریق اولین دوز STZ)، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ بررسی شد. (قبل از ارزیابی، تمامی گروه ها به مدت ۴ ساعت در حالت ناشتا نگهداری شدند). قند خون بالای ۲۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شد [۱۳].

آسان کشی و برداشت طحال

موش ها بعد از آخرین اندازه گیری قند خون به آزمایشگاه ایمنولوژی انتقال یافته و توسط ترکیب کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) آسان کشی شده و مراحل برداشت طحال با رعایت اصول بهداشتی انجام و بلافاصله به محیط کشت RPMI انتقال یافت [۱۴].

تست تکثیر لنفوسیتی

جهت سنجش تکثیر لنفوسیتی، بافت طحال در ۱۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 (شرکت Sigma - آمریکا) حاوی ۱۰ درصد، FBS (شرکت Gibco - آلمان) قطعه قطعه و له شد. بافت حاصل از توری سیمی به قطر ۰/۲ میلی متر عبور داده شده و پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور، به منظور حذف RBC ها، بر روی رسوب سلولی به دست آمده ۱۵ میلی لیتر بافر لیزکننده افزوده شد. پس از پستشو و سانتریفیوژ، رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. پس از شمارش سلول ها سوسپانسونی حاوی $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ تهیه شده و $100 \mu\text{l}$ از آن در هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای ته تخت ریخته شد. برای هر نمونه سه تکرار بدون حضور پادگن و سه تکرار در حضور $50 \mu\text{l}$ از محلول فیتوهمگلوتینین (۱ mg/ml) در نظر گرفته شد. به عنوان بلانک نیز در سه چاهک از محیط RPMI خالی استفاده شد. بعد از ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 به هر چاهک $25 \mu\text{l}$ محلول MTT 5 mg/ml در PBS افزوده شده و به مدت ۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری شد. DMSO اضافه شده و سپس شدت رنگ در طول موج ۴۹۰ nm تعیین و ایندکس تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه شد [۱۵].

تست انفجار تنفسی

$2 \times 10^6 \text{ cell/ml}$ از سلول ها در پلیت های کشت ۲۴ خانه به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد، سپس خانه ها با محیط کشت هنکس



گروه دیابتی نسبت به موش‌های گروه کنترل حداقل ۳/۷۸ برابر بود. در موش‌های گروه درمانی (Treatment) سطح قند خون مشابه موش‌های دیابتی شده در هفته اول است ولی به تدریج در هفته دوم میزان قند خون رو به کاهش بوده است. به طوری که تغییرات قند خون در هفته دوم و سوم نسبت به موش‌های گروه STZ شروع به کاهش یافت. این تغییر از هفته سوم به بعد از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/05$). کاهش قند خون در موش‌های دیابتی شده در موش‌های پیش‌درمانی (Pre-Treatment) از همان هفته اول پس از تجویز STZ کاملاً مشهود بود. با این وجود این موش‌ها نیز نسبت به گروه کنترل افزایش قند حداقل ۳/۳ برابری را نشان می‌دادند. کاهش سطح قند خون در این موش‌ها از همان هفته اول نسبت به گروه STZ کاملاً معنی‌دار بود و در سرتاسر مطالعه نیز همچنان معنی‌دار باقی ماند ($P < 0/05$). در مجموع می‌توان گفت که گروه پیش‌درمانی در کاهش قند خون، نسبت به گروه درمانی موفق‌تر بوده است و توانسته در سرتاسر مطالعه اختلاف معنی‌دار خود را با گروه STZ حفظ کند. با این حال برآیند این دو درمان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0/05$).

نتایج ایمونولوژی

نتایج تست تکثیر لئوسیتی (MTT) از نظر آماری بررسی شده و در قالب نمودار شماره ۲ ارائه شده است. نتایج نمودار شماره ۲ حاکی از افزایش معنی‌دار تکثیر لئوسیت‌های طحال در پاسخ به میتوزن (PHA) در گروه موش‌های دیابتی نسبت به موش‌هایی سالم می‌باشد ($P < 0/05$). این تکثیر هم در گروه پیش‌درمانی و هم در گروه درمانی با عصاره‌ی برگ گیاه چغندر قند به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($P < 0/05$) که نشان دهنده‌ی تأثیر مثبت درمان با عصاره می‌باشد. ظاهراً میزان این اثر در گروه پیش‌درمانی بیشتر از گروه درمانی بوده است، با این وجود تفاوت بین گروه پیش‌درمانی و گروه درمانی معنی‌دار نیست ($P > 0/05$).

نتایج تست انفجار تنفسی (NBT) نیز از نظر آماری بررسی شده و در قالب نمودار شماره ۳ ارائه شده است.

به منظور حذف لئوسیت‌ها شستشو داده شدند. سلول‌های باقیمانده (مونوسیت/ماکروفاژها) به مدت یک ساعت با مخمر اپسونیزه انکوبه شد. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر محلول زیموزان و NBT (نیترو بلو تترازولیوم) به هریک از خانه‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت دیگر انکوبه شد. در نهایت ۴۰۰ میکرولیتر N-N دی‌متیل فورماید به هر یک از خانه‌ها اضافه شد و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی از هر یک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و نتیجه با الیزانگار در طول موج ۵۴۰ nm قرائت شد [۱۵].

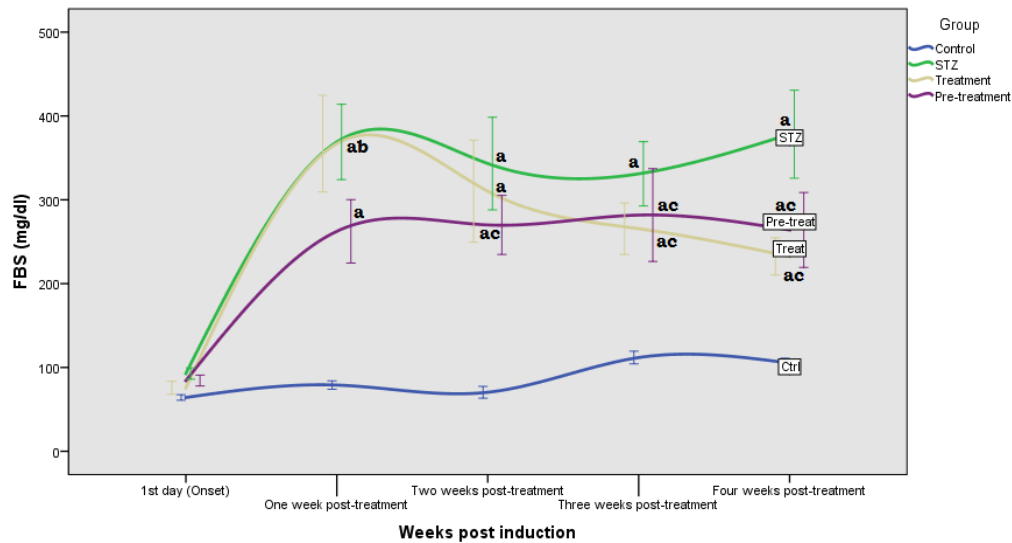
آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش‌های مبتنی بر روش‌های آماری مورد بررسی قرار گرفت. فرض نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفت. میانگین داده‌ها در چهار گروه مورد بررسی از نظر وجود اختلاف معنی‌دار با استفاده از آزمون One Way ANOVA انجام شد و همچنین با استفاده از آزمون تعقیبی TUKEY مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

نتایج قند خون (گلوکومتری)

قند خون موش‌ها بعد از اندازه‌گیری و ثبت شدن در هفته‌های مختلف مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت که به طور مشترک در یک نمودار بیان شد. با توجه به نمودار شماره ۱، تغییرات قند خون حاکی از افزایش قابل توجه سطح قند خون در موش‌های دیابتی شده نسبت به موش‌های سالم می‌باشد. تفاوت قند خون در هفته اول پس از تجویز دوز پنجم STZ نسبت به گروه کنترل کاملاً مشهود است. به طوری که یک افزایش حداقل ۴/۰۷ برابری در سطح قند خون، نسبت به موش‌های گروه STZ مشاهده می‌شود. تغییرات قند خون کم و بیش تا انتهای مطالعه وجود داشت به طوری که در آخر مطالعه سطح قند خون موش‌های



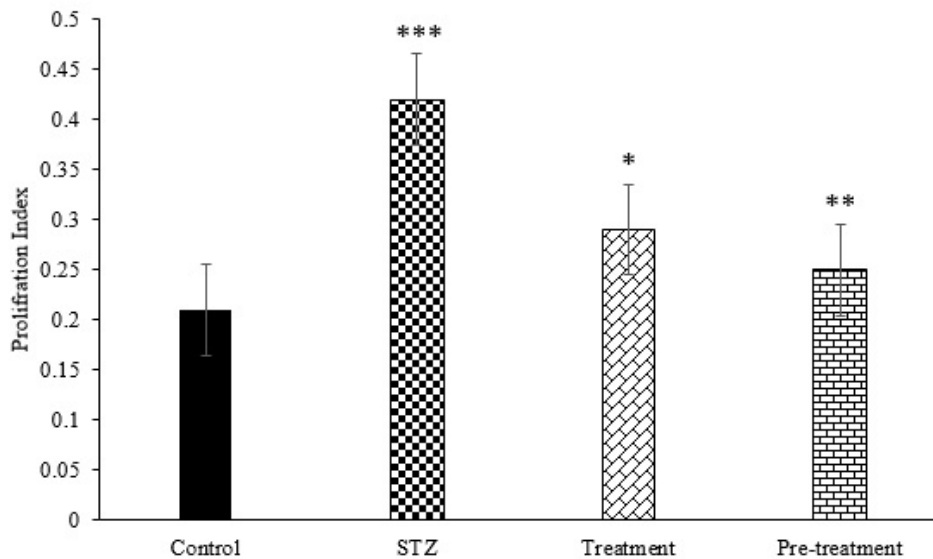
نمودار شماره ۱- بررسی تغییرات هفتگی قند خون پس از القا دیابت (واحد اندازه گیری قند خون mg/dl است)

a: نشان دهندهی اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل ($P < 0/05$)

b: نشان دهندهی اختلاف معنادار نسبت به موش های گروه پیش درمانی ($P < 0/05$)

c: نشان دهندهی اختلاف معنادار نسبت به موش های گروه دیابتی ($P < 0/05$)

Control: گروهی که هیچ ماده ای دریافت نکردند، STZ: گروه دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین، Treatment: گروه دریافت کننده عصاره ۲۴ ساعت بعد از دریافت استرپتوزوتوسین، Pretreatment: گروه دریافت کننده عصاره به همراه دریافت استرپتوزوتوسین

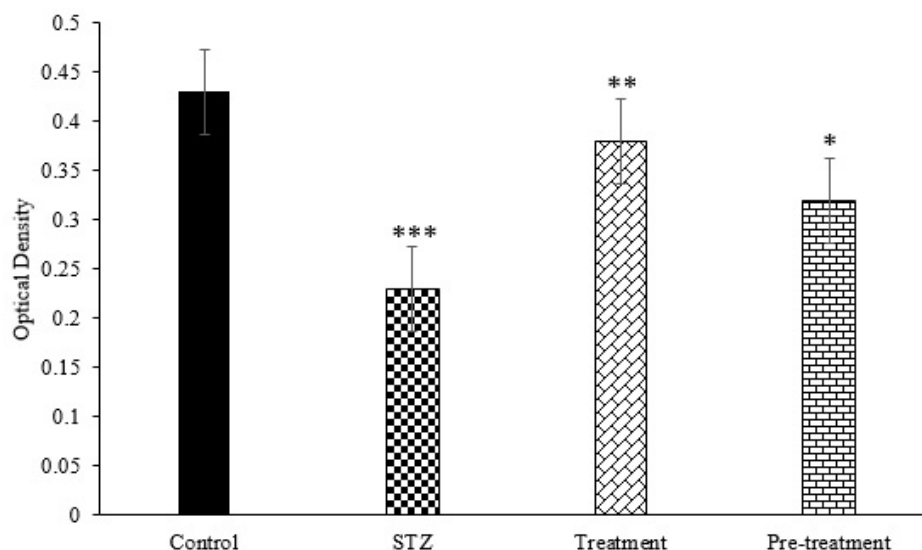


نمودار شماره ۲- نتایج تست نکثیر لنفوسیتی جهت نشان دادن تأثیر عصاره ی برگ گیاه چغندر قند در گروه های درمانی و پیش درمانی در مقایسه با

گروه های دیابتی و کنترل. **، * ($P < 0/05$)

Control: گروهی که هیچ ماده ای دریافت نکردند، STZ: گروه دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین، Treatment: گروه دریافت کننده عصاره ۲۴ ساعت بعد از دریافت استرپتوزوتوسین، Pretreatment: گروه دریافت کننده عصاره به همراه دریافت استرپتوزوتوسین





نمودار شماره ۳- نتایج تست انفجار تنفسی جهت نشان دادن تأثیر عصاره‌ی برگ گیاه چغندر قند در گروه‌های درمانی و پیش‌درمانی در مقایسه با گروه‌های دیابتی و کنترل. **، * (P<۰/۰۵)

Control: گروهی که هیچ ماده‌ای دریافت نکردند، **STZ:** گروه دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین، **Treatment:** گروه دریافت‌کننده عصاره ۲۴ ساعت بعد از دریافت استرپتوزوتوسین، **Pre-treatment:** گروه دریافت‌کننده عصاره به همراه دریافت استرپتوزوتوسین

به طور کامل مشابه آنچه که در انسان رخ می‌دهد، نمی‌باشد [۹]. این واقعیت باعث شده است که برای ایجاد مدل‌های مشابه‌تر با مدل دیابت تیپ ۱ انسانی تلاش‌هایی صورت بگیرد که از جمله‌ی آن دیابت خود ایمن القا شده بوسیله‌ی سیکلوفسفامید و یا تجویز متعدد دوزهای پایین استرپتوزوتوسین می‌باشد. سیکلوفسفامید با مهار سلول‌های T تنظیمی و افزایش واکنش سیستم ایمنی علیه سلول‌های بتای پانکراس و استرپتوزوتوسین با اثر مستقیم روی سلول‌های پانکراس، باعث آسیب دیدن آنها و واکنش‌پذیری لنفوسیت‌ها علیه آن می‌شود [۱۸]. در مطالعه‌ی حاضر، از موش‌های نژاد خالص C57/BL6 استفاده شد که علت این انتخاب، استعداد ذاتی این موش‌ها به دیابت خود ایمن می‌باشد [۱۹]. به منظور القای دیابت تیپ یک، مشابه آنچه که در مطالعات گذشته به عنوان مدل‌های پیش‌کلینیکی دیابت خود ایمن در نظر گرفته شده است [۱۸، ۱۰]، از تجویز متعدد دوز پایین استرپتوزوتوسین (۴۰ mg/kg) استفاده شد.

نتایج نشان می‌دهد میزان انفجار تنفسی سلول‌های ذاتی طحال، در گروه دیابتی به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است (P<۰/۰۵). درمان با عصاره‌ی برگ گیاه چغندر قند این فعالیت سلول‌های ذاتی را به طور قابل توجهی افزایش داده (P<۰/۰۵) به طوری که میزان آن در گروه درمان به حالت نرمال (گروه کنترل) نزدیک شده و اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل ندارد (P>۰/۰۵). گروه پیش‌درمان نیز اثر مشابه ولی ضعیف‌تری نسبت به گروه درمانی داشته اما این حال نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی‌داری دارد (P>۰/۰۵).

بحث

تاکنون مدل‌های حیوانی متنوعی برای مطالعه‌ی دیابت مورد استفاده قرار گرفته است. از جمله‌ی آنها می‌توان به موش‌های NOD، BALB/cByJ و C57/BL6 [۱۶]، اشاره کرد. همچنین موش‌های تغییر یافته‌ی ژنتیکی نیز که استعداد بیشتری برای ابتلا به دیابت دارند، بدین‌منظور مورد استفاده قرار گرفته اند [۱۷]. با این وجود، روند بیماری در این مدل‌ها



می‌باشد [۲۱]. بنابراین، این افراد در معرض ابتلا به عفونت‌های چرک زای بیشتری قرار دارند. نتایج حاصل از این تحقیق نشانگر کاهش شدید و معنی‌دار شدت انفجار تنفسی در جمعیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده‌ی طحال در گروه موش‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل می‌باشد. خوشبختانه عصاره‌ی آبی برگ گیاه چغندر قند تا حدودی در اصلاح این نقیصه کارآمد بوده است به طوری که چه در گروه پیش‌درمانی و چه در گروه درمان، سطح انفجار تنفسی نسبت به گروه موش‌های دیابتی، به طور قابل توجهی افزایش یافته است. این در حالی است که نسبت به گروه کنترل همچنان در وضعیت پایین‌تری قرار دارد که این حقیقت، نتایج حاصل را مطلوب‌تر می‌سازد. در مطالعه‌ی که در سال ۲۰۱۴ توسط مارتینز (Martinez) و همکاران صورت گرفت، نشان داده شد که بتالاین موجود در گیاه چغندر قند باعث کاهش سایتوکاین‌هایی نظیر $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ و همچنین بکارگیری لنفوسیت‌ها در نواحی ملتهب شده و از این طریق اثر ضدالتهابی خود را برجای می‌گذارد. مطالعه‌ی اشاره شده بیان می‌دارد که این ماده می‌تواند در بیماری‌هایی که التهاب در پاتوژنز آنها نقش دارد، نقش مؤثری ایفا کند [۲۲]. یافته‌های این مطالعه هماهنگ با نتایج مطالعه‌ی حاضر در کاهش فعالیت سلول‌های لنفوسیتی می‌باشد. با توجه به اثر کاهنده‌ی این ماده بر روی سایتوکاین‌های التهابی $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ که در فراخوانی لوکوسیتی به نواحی التهابی دخالت دارند، اثرات مثبت آن در کاهش عوارض دیابت تجربی خود ایمن تا حدی قابل توجیه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تلاش شد تا تأثیر تجویز خوراکی عصاره‌ی آبی برگ گیاه چغندر قند (*Beta vulgaris* subsp. *Cicla*) به عنوان مواد زاید جامد کشاورزی بر روی سیمای ایمونولوژیک در موش‌های دیابتی شده توسط STZ مورد بررسی قرار گیرد. نتایج نشان داد که تجویز عصاره‌ی برگ گیاه چغندر به طور معنی‌داری باعث کاهش قند خون در موش‌های دیابتی شده و گیاه استفاده شده اثرات ایمونوساپرسیو نامطلوبی ندارد. بر اساس یافته‌های حاصل از این پژوهش نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره‌ی برگ گیاه چغندر قند اثرات

مقایسه‌ی نتایج قند خون و هیستوپاتولوژیک بین گروه‌های STZ و کنترل، به طور هماهنگ با مطالعات قبلی تأییدکننده‌ی اثرگذاری استرپتوزوتوسین و القای موفق دیابت در این مطالعه بود. در نتیجه‌ی تفسیر قند خون می‌توان گفت که در مجموع گروه پیش‌درمانی در کاهش قند خون، نسبت به گروه درمانی موفق‌تر بوده است و توانسته در سرتاسر مطالعه اختلاف معنی‌دار خود را با گروه STZ حفظ کند. با این حال برآیند این دو درمان تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). در مطالعه‌ی، Bolkent و همکاران نیز در سال ۲۰۰۰، اثرات هایپو گلاسمیک مشابهی را برای این گیاه در موش صحرائی نشان دادند. مکانیسم پیشنهاد داده شده در این مطالعه، بهبود وضعیت سلول‌های جزایر لانگرهانس تخریب شده و در نتیجه ترشح بهبود یافته‌ی انسولین در موش‌های تیمار شده با عصاره‌ی گیاه چغندر بود [۱۱]. یک مطالعه‌ی اخیراً صورت گرفته در سال ۲۰۱۵، دخالت استیل کولین را در ایجاد اثرات هایپوگلاسمیک این گیاه نشان داد. مکانیسم پیشنهادی دیگر، افزایش انتقال‌دهنده‌های گلوکز در عضلات اسکلتی و افزایش سنتز کلیگوژن می‌باشد [۲۰]. نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز با نتایج مطالعات قبلی هماهنگ بوده و نشان می‌دهد که استفاده از عصاره‌ی این گیاه به صورت پیش‌درمانی مؤثرتر خواهد بود. افزایش مشاهده شده در تکثیر لنفوسیتی طحال در گروه موش‌های دیابتی نسبت به موش‌هایی سالم، نمایانگر افزایش تعداد لنفوسیت‌های خود واکنش‌گر در گروه موش‌های دیابتی شده (مبتلا به دیابت خودایمن) نسبت به گروه کنترل می‌باشد. خوشبختانه نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده کردن از عصاره‌ی آبی برگ گیاه چغندر قند، میزان تکثیر این لنفوسیت‌ها را به طور معنی‌داری کاهش داده است به طوری که از نظر آماری بین گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره به صورت پیش‌درمانی و گروه STZ، اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با همه‌ی این تفاسیر به نظر نمی‌رسد که گیاه استفاده شده در این مطالعه اثرات ایمونوساپرسیو شدید و نامطلوبی داشته باشد زیرا در گروه دریافت‌کننده‌ی عصاره، همچنان پاسخ لنفوسیتی نسبت به گروه کنترل بیشتر می‌باشد. یکی از اثراتی که دیابت بر فرد دیابتی تحمیل می‌کند، کاهش فعالیت سیستم ایمنی ذاتی



تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای آقای میلاد مولودی زرگری در دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به شماره ثبت ۱۴۷۴ و حاصل طرح تحقیقاتی (۹۴/۴۷۹) مصوب مرکز تحقیقات مهندسی بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان بوده که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری این دانشگاه به انجام رسیده است.

مثبتی در کاهش عوارض و تغییرات ایمونولوژیک مدل دیابت خود ایمن در موش دارد. به نظر می‌رسد این اثرات ناشی از مکانیسم‌های ایمونومادولاتوری این عصاره هستند و همزمان اثرات متفاوتی بر روی بازوهای مختلف سیستم ایمنی دارد که در مجموع به نفع بهبودی علائم و پاتوژنز دیابت می‌باشد. با این حال، جهت به دست آوردن مکانیسم‌های اثر دقیق این گیاه و مواد اصلی مؤثر در این رابطه، مطالعات دقیق‌تر در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

1. Pane JA, Webster NL and Coulson BS. Rotavirus activates lymphocytes from non-obese diabetic mice by triggering toll-like receptor 7 signaling and interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS Pathog* 2014; 10 (3): e1003998.
2. Rostambeigy P, Ghaemi SZ, Shirazi FM Hashemi N. The Effects of Nutrition Education and Insulin Injection Training on Glycemic Control in Iranian Patients with Type 1 Diabetes. *Advances in BioResearch* 2014; 5 (2): 143-147.
3. Gheibi N, Parvizi M, Jahani Hashemi H. The effect of cinnamon on glucose concentration of diabetic rats in presence or absence of insulin. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences* 2005; 9 (3): 3-8.
4. Yousefipoor P, Tadibi V, Behpoor N, Parnow A and Delbari ERashidi S. The Effect of 8-week Aerobic and Concurrent (aerobic- resistance) Exercise Training on Serum IL-6 Levels and Insulin Resistance in Type 2 Diabetic Patients. *The Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2013; 21 (5): 619-31.
5. El Gamal AA, AlSaid MS, Raish M, Al-Sohaibani M, Al-Massarani S M, Ahmad A, et al. Beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity associated oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rodent model. *Mediators of Inflammation* 2014; 2014: 1-12.
6. Garetto S, Trovato AE, Lleo A, Sala F, Martini E, Betz A G, et al. Peak inflammation in atherosclerosis, primary biliary cirrhosis and autoimmune arthritis is counter-intuitively associated with regulatory T cell enrichment. *Immunobiology* 2015; 220 (8): 1025-9.
7. Bolkent S, Yanardag R, Tabakoglu-Oguz A and Ozsoy-Sacan O. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. Cicla) extract on pancreatic B cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 73 (1-2): 251-9.
8. Janiszewska E. Microencapsulated beetroot juice as a potential source of betalain. *Powder Technology* 2014; 264: 190 - 6.
9. Wei L, Lu Y, He S, Jin X, Zeng L, Zhang S, et al. Induction of diabetes with signs of autoimmunity in primates by the injection of multiple-low-dose streptozotocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 412 (2): 373-8.
10. Amirshahrokhi K, Dehpour A, Hadjati J, Sotoudeh M and Ghazi-Khansari M. Methadone ameliorates multiple-low-dose streptozotocin-induced type 1 diabetes in mice. *Toxicology and Applied Pharmacol.* 2008; 232 (1): 119-24.



- 11.** Bolkent Ş, Yanardağ R, Tabakoğlu-Oğuz A and Özsoy-Saçan Ö. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) extract on pancreatic B cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study. *Journal of Ethnopharmacol.* 2000; 73 (1): 251 - 9.
- 12.** Putnoky S and Caunii A Butnariu M. Study on the stability and antioxidant effect of the *Allium ursinum* watery extract. *Chem. Cent. J.* 2013; 7 (1): 21.
- 13.** Kumar PS, Bhaumik A and Chopra MKN. D. Evaluation of Anti diabetic activity of Ethanolic Extract of Beet Root (EEBT-*Beta vulgaris*) against Streptozocin induced diabetic Rats. *Journal of Drug Discovery and Therapeutics* 2016; 4 (37): 1-6.
- 14.** Traslavina R P, King E J, Loar A S, Riedel E R, Garvey M S, Ricart-Arbona R, et al. Euthanasia by CO₂ inhalation affects potassium levels in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2010; 49 (3): 316-22.
- 15.** Abtahi Froushani SM and Esmaili Gourvarchin Galeh H. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2014; 17 (9): 632-7.
- 16.** Rubinstein M, Genaro AM and Wald MR. Differential effect of hyperglycaemia on the immune response in an experimental model of diabetes in BALB/cByJ and C57Bl/6J mice: participation of oxidative stress. *Clinical & Experimental Immunology* 2013; 171 (3): 319-29.
- 17.** Abari E, Kociok N, Hartmann U, Semkova I, Paulsson M, Lo A, et al. Alterations in basement membrane immunoreactivity of the diabetic retina in threedabetic mouse models. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 2013; 251 (3): 763-75.
- 18.** Stošić-Grujičić S and Cvjetičanin T Stojanović I. Retinoids differentially regulate the progression of autoimmune diabetes in three preclinical models in mice. *Molecular Immunol.* 2009; 47 (1): 79-86.
- 19.** Zenobi A and Gandolfi FBrevini TAL. Role of oxygen tension and genetic background during the epigenetic conversion of mouse fibroblasts into insulin secreting cells. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety* 2015; 2: (1s).
- 20.** Kabir AU, Samad MB, Ahmed A, Jahan MR, Akhter F, Tasnim J, et al. Aqueous fraction of *Beta vulgaris* ameliorates hyperglycemia in diabetic mice due to enhanced glucose stimulated insulin secretion, mediated by acetylcholine and GLP-1, and elevated glucose uptake via increased membrane bound GLUT4 transporters. *PloS One* 2015; 10 (2): e0116546.
- 21.** Geerlings SE and Hoepelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 1999; 26 (3-4): 259 - 65.
- 22.** Martinez RM, Longhi-Balbinot DT, Zarpelon AC, Staurengo-Ferrari L, Baracat MM, Georgetti S R, et al. Anti-inflammatory activity of betalain-rich dye of *Beta vulgaris*: effect on edema, leukocyte recruitment, superoxide anion and cytokine production. *Archives of Pharmacal Research* 2015; 38 (4): 494-504.



Evaluation of The Effects of a Natural Preparation of Sugar Beet (*Beta vulgaris* subsp. *Cicla*) as a Agriculture Solid Waste on Diabetic Mice

Malakootian M (Ph.D.)¹, Moloodizargari M (Ph.D. Student)^{2,3}, Asghari MH (Ph.D. Student)⁴, JafariMansoorian H (Ph.D. Student)^{1,5,6*}

1- Environmental Health Engineering Research Center, Department of Environmental Health Engineering, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3- Young Researchers and Elite Club, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

4- Young Researchers and Elite Club, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

5- Ph.D student of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Science

6- Young Researchers and Elite Club, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran

*Corresponding author: Environmental Health Engineering Research Center, Department of Environmental Health Engineering, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Tel: +98-34-31325074, +98-34-31325105

Email: h.mansoorian@yahoo.com

Abstract

Background: Diabetes type I is a chronic disease mediated by the immune system that the prevalence of it's in the past two decades has dramatically increased.

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of oral administration of the aqueous extract of the leaf of sugar beet on the immunological aspect of STZ induced diabetes in mice.

Methods: For this purpose, 20 male inbred C57 BL/6 mice with 6-8 weeks of age were divided into 4 groups of 5 including: control, diabetic, treatment and pre-treatment groups. In the second, third and the fourth groups, five consecutive daily injections of 40 mg/kg STZ were performed to induce diabetes. The fasting blood sugar was recorded on a weekly basis. At the end, the mice were euthanized and after the removal of the spleens and the preparation of cell cultures, the cells were tested to determine the extent of lymphocyte proliferation and the severity of respiratory burst.

Results: The results showed that the administration of Chard extract can significantly reduce blood glucose levels in diabetic mice ($P<0.05$). The lymphocytes proliferation in the treatment and pre-treatment groups showed a significant decrease compared to the diabetic group ($P<0.05$). Moreover, treatment with the extract significantly restored the reduced respiratory burst in the diabetic group to levels similar to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: In summary, the leaf extract of Chard has a positive effect on the immunological changes and can reduce the complications of autoimmune diabetes in mouse models.

Keywords: Autoimmune diabetes, Chard, Lymphocyte proliferation, Streptozotocin

