Downloaded from jmp.ir at 6:02 +0430 on Friday August 17th 2018

بررسی تأثیر فرآوری با سرکه و آب نمک بر سمیت و خاصیت ضددیابتی عصاره میوه حنظل (*Citrullus colocynthis* (L.) Schrad.) در موش صحرایی

حسن فلاح حسینی[1]، سعید کیان‌بخت[1]*، رامین موسوی[2]، نفیسه امن‌زاده[3]

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی و طب کاربردی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

۲- کارشناس آزمایشگاه، گروه فارماکولوژی و طب کاربردی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، کرج

۳- دانشجوی داروسازی، دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

*آدرس مکاتبه: کرج، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی، صندوق‌پستی (مهرویلا): ۳۶۹- ۳۱۳۷۵

تلفن: ۹- ۴۷۶۴۰۱۰ (۰۲۶۱)، دورنگار: ۴۷۶۴۰۲۱ (۰۲۶۱)

پست الکترونیک: skianbakht@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۲۷ **تاریخ تصویب:** ۹۰/۱۰/۶

چکیده

مقدمه: میوه حنظل برای درمان دیابت مصرف می‌شود. حنظل در حیوانات دیابتی و بیماران دیابتی نوع دوم، سطح گلوکز خون را کنترل نموده است. حنظل در دوزهای بالا سمی است که جهت کاهش سمیت، آن را مدتی در سرکه یا آب نمک قرار می‌دهند.

هدف: تأثیر فرآوری با سرکه و آب نمک بر سمیت و خاصیت ضددیابتی حنظل در موش صحرایی بررسی شد.

روش بررسی: تعیین LD_{50} (دوز کشنده میانه): عصاره‌های هیدروالکلی فرآوری نشده و فرآوری شده با آب نمک و سرکه حنظل در دوزهای مختلف از راه خوراکی یک مرتبه به گروه‌های ۱۰ تایی موش‌های صحرایی نر و ماده ویستار سالم گاواژ و تعداد حیوانات مرده در هر گروه طی ۷۲ ساعت پس از گاواژ مشخص شد. بررسی اثر ضددیابتی: موش‌های صحرایی نر ویستار با تزریق صفاقی ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلوکسان دیابتی شدند. هر عصاره با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه برای مدت ۱ ماه به گروه ۱۰ تایی موش‌های دیابتی گاواژ و سرانجام سطح گلوکز خون به دست آمده از ورید دمی (به روش گلوکز اکسیداز) پس از ۸ ساعت ناشتایی تعیین شد.

نتایج: LD_{50} عصاره‌های فرآوری نشده و فرآوری شده با آب نمک و سرکه به ترتیب ۲۰۰، ۲۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. سه عصاره سطح گلوکز خون را به طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل کاهش دادند ($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: فرآوری با آب نمک یا سرکه می‌تواند سمیت حنظل را ضمن حفظ اثر ضددیابتی کاهش دهد.

گل‌واژگان: حنظل، سمیت، دیابت، موش صحرایی

Downloaded from jmp.ir at 6:02 +0430 on Friday August 17th 2018

مقدمه

دیابت شیرین، شایع‌ترین بیماری متابولیک است. شیوع دیابت تقریباً ٦ درصد جمعیت است و ۹۰ تا ۹۵ درصد آن را دیابت نوع ۲ تشکیل می‌دهد. اگر دیابت به طور مناسبی درمان نشود، به عوارضی مانند آتروسکلروز و بیماری‌های شبکیه، کلیه، اعصاب و گانگرن دست و پا منجر می‌شود. عوارض نامبرده، علت اصلی بیماری‌ها و مرگ‌های ناشی از دیابت هستند [۱،۲]. انسولین و داروهای خوراکی ضدافزایش گلوکز خون مانند بی‌گوانیدها، سولفونیل اوره‌ها، تیازولیدین دیون‌ها و مهارکننده‌های آلفاگلوکزیداز، اساس درمان دیابت هستند. داروهای نامبرده عوارض نامطلوب مهمی دارند و همیشه قادر نیستند گلوکز خون را در سطح طبیعی حفظ و به طور معنی‌دار از عوارض دیابت پیشگیری نمایند [۳،٤]. بنابراین، نیاز مستمری برای یافتن داروهای ضددیابت جایگزین با نسبت خطر - منفعت بهتر و مقبولیت بیشتر نزد بیماران وجود دارد [۱،۲،٤]. گیاهان همیشه منشاء داروها بوده‌اند و بسیاری از داروهای موجود به طور مستقیم یا غیرمستقیم از گیاهان مشتق شده‌اند. مطالعات اتنوبوتانیک، بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی با اثرات ضددیابت بالقوه را گزارش نموده‌اند [۵].

میوه رسیده (زرد) حنظل (هندوانه ابوجهل) *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. (Cucurbitaceae) به طور سنتی در کشورهای مدیترانه‌ای از جمله ایران برای درمان دیابت مصرف می‌شود [٦]. حنظل سطح گلوکز خون ناشتا را در موش صحرایی و خرگوش دیابتی شده با استرپتوزوسین و آلوکسان [٦،۷] و سطوح خونی گلوکز ناشتا و هموگلوبین گلیکوزیله را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دوم [۸] کاهش داده است. حنظل گیاهی بسیار سمی محسوب می‌شود [۹]. در طب سنتی ایران، به منظور کاهش سمیت (toxicity)، میوه حنظل را برای مدتی در سرکه یا آب نمک قرار می‌دهند که نوعی فرآوری (processing) محسوب می‌شود. تاکنون اثر فرآوری با سرکه و آب نمک بر سمیت و خاصیت ضددیابتی حنظل مورد بررسی قرار نگرفته است. به همین علت، تأثیر فرآوری با سرکه و آب نمک بر دوز کشنده میانه (median lethal dose or LD_{50}) (یک نوع آزمایش سمیت حاد) و خاصیت ضددیابتی حنظل در موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

داروها و مواد

آلوکسان و گلی بن کلامید از شرکت سیگما و DMSO (دی متیل سولفوکسید) (همه با خلوص بالای ۹۹ درصد) از شرکت مرک تهیه شدند.

تهیه گیاه

میوه رسیده حنظل در پایان تیر ماه از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی واقع در کرج جمع‌آوری و در سایه خشک شد. نمونه‌ای از گیاه با شماره ۳۰۸ در هرباریوم پژوهشکده گیاهان دارویی قرار داده شد.

عصاره‌گیری

میوه خشک عاری از دانه پودر شد. از ٦۰۰ گرم پودر حاصل در پرکولاتور با اتانول ۷۰ درصد به مدت ٤۸ ساعت با سه بار تکرار عصاره‌گیری انجام و با استفاده از دستگاه روتاری و فریز درایر کاملاً خشک شد. بازده عصاره‌گیری ۸ درصد بود.

فراوری عصاره با آب نمک و سرکه

۱- آب نمک: بر روی ۱۵ گرم عصاره خشک، ۱۰ میلی‌لیتر آب نمک ۱۰ درصد ریخته و به مدت ۱ هفته در یخچال نگهداری شد.

۲- سرکه: بر **روی** ۱۵ گرم عصاره خشک، ۱۰ میلی‌لیتر سرکه ریخته و به مدت ۱ هفته در یخچال نگهداری شد.

تهیه حیوان آزمایشگاهی

موش‌های صحرایی (rat) نر و ماده نژاد ویستار با دامنه وزنی حدود ۲۵۰ - ۲۰۰ گرم از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی خریداری شد. این موش‌ها در گروه‌های مساوی در محل حیوان‌خانه مجتمع تحقیقاتی جهاددانشگاهی

Downloaded from jmp.ir at 6:02 +0430 on Friday August 17th 2018

در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در درجه حرارت ۳ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات به آب و غذا، آزادانه دسترسی داشتند.

تهیه محلول عصاره‌ها و گلی بن کلامید

عصاره‌های خشک و گلی بن کلامید به میزان یک گرم در ۱ میلی‌لیتر DMSO خالص حل و سپس با اضافه نمودن آب مقطر، رقیق (غلظت نهایی DMSO برابر با ۱۰ درصد بود) و استفاده شد.

بررسی سمیت عصاره‌های فرآوری نشده و فرآوری شده با نمک و سرکه

برای ارزیابی سمیت، عصاره‌های فرآوری نشده و فرآوری شده با آب نمک و سرکه در حلال DMSO ۱۰ درصد در دوزهای مختلف در حجم ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم، از راه خوراکی یک مرتبه به گروه‌های ۱۰ تایی موش‌های صحرایی سالم (شامل ۵ موش نر و ۵ موش ماده) گاواژ، تعداد حیوانات مرده در هر گروه طی ۷۲ ساعت پس از گاواژ عصاره تعیین و LD_{50} هر عصاره محاسبه شد. دوزهای مورد استفاده برای هر عصاره عبارت بودند از: ۴۰۰، ۳۰۰، ۲۵۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم.

ایجاد دیابت

جهت ایجاد دیابت، آلوکسان با دوز ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پس از ۲۴ ساعت ناشتایی از راه صفاقی به موش‌ها تزریق شد. پس از گذشت ۲ هفته، ضمن مشاهده علایم دیابت به صورت کاهش وزن، پرنوشی و پرادراری، با اندازه‌گیری سطح گلوکز خون به دست آمده از ورید دمی (به روش گلوکز اکسیداز) پس از ۸ ساعت ناشتایی، موش‌های دارای سطح گلوکز خون بیشتر از mg/dL ۱۳۰ به عنوان دیابتی، شناسایی و در گروه‌های ۱۰ تایی به طور تصادفی تقسیم شدند.

تجویز عصاره‌ها و گلی بن کلامید به موش‌ها

عصاره‌ها در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از راه گاواژ تأثیر معنی‌داری بر سطح گلوکز خون ناشتا نداشتند و در دوزهای بالاتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث مرگ و میر می‌شدند. بنابراین، هر یک از ۳ نوع عصاره و گلی بن‌کلامید در حلال DMSO ۱۰ درصد حل، عصاره‌ها با دوز روزانه ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گلی بن کلامید با دوز روزانه ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حجم ۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم از راه گاواژ ابتدا برای ۱ هفته و پس از مشاهده تأثیر معنی‌دار این دوز بر سطح گلوکز خون ناشتا در مقایسه با کنترل، برای مدت ۱ ماه به گروه‌های ۱۰ تایی موش‌های دیابتی به ترتیب زیر تجویز و پس از ۱ ماه، سطح گلوکز خون به دست آمده از ورید دمی (به روش گلوکز اکسیداز) پس از ۸ ساعت ناشتایی تعیین شد:

گروه ۱ (کنترل): تیمار با DMSO ۱۰ درصد.

گروه ۲: تیمار با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره فرآوری نشده.

گروه ۳: تیمار با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره فرآوری شده با آب نمک.

گروه ٤: تیمار با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره فراوری شده با سرکه.

گروه ۵: تیمار با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلی بن کلامید.

تحلیل آماری

برای مقایسه نتایج سطح گلوکز ناشتای هر گروه با کنترل پس از ۱ ماه مصرف دارو از آزمون آماری t غیر مزدوج و برای مقایسه نتایج سطوح گلوکز ناشتای سه نوع عصاره با یکدیگر از تحلیل واریانس یک طرفه استفاده و $p < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

LD_{50} عصاره فرآوری نشده ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، عصاره هیدروالکلی فرآوری شده با نمک ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عصاره هیدروالکلی فرآوری شده با سرکه ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. مرگ و میر حیوانات نر و ماده تقریباً با هم برابر بود. سه نوع عصاره و گلی‌بن‌کلامید پس از ۱ ماه، سطح گلوکز ناشتا را به طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل کاهش دادند ($p < ۰/۰۵$). مقایسه سطوح خونی گلوکز ناشتای سه گروه عصاره با یکدیگر پس از ۱ ماه مصرف عصاره‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p > ۰/۰۵$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱ - سطح گلوکز خون ناشتا (mg/dL) قبل و پس از ۱ ماه گاواژ روزانه در گروه‌های موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان بر حسب انحراف معیار ± میانگین. مقدار عدد p مربوط به مقایسه سطح گلوکز ناشتای هر گروه با کنترل پس از ۱ ماه مصرف دارو با آزمون t محاسبه شده و p < ۰/۰۵ معنی‌دار است. مقایسه سطوح خونی گلوکز ناشتای سه گروه عصاره با یکدیگر پس از ۱ ماه مصرف عصاره‌ها با تحلیل واریانس یک طرفه تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p > ۰/۰۵)

ردیف	گروه (n = ۱۰)	سطح گلوکز خون ناشتا قبل از دارو	سطح گلوکز خون ناشتا پس از ۱ ماه مصرف دارو	مقدار عدد p
۱	کنترل (DMSO ۱۰ درصد)	۳۹۸/۰ ± ۱۶۲/۳	۳۷٤/۲ ± ۲٦/۸	
۲	دوز mg/kg ۲۰ عصاره فرآوری نشده حنظل	۳۸۰/۰ ± ۱۵۱/۵	۳٤٤/۲ ± ۲۷/۱	۰/۰۲۳
۳	دوز mg/kg ۲۰ عصاره فراوری شده با آب نمک حنظل	۳٦۲/۸ ± ۱۷۰/۳	۳۰٦/۲ ± ٦۵/۸	۰/۰۱۱
٤	دوز mg/kg ۲۰ عصاره فراوری شده با سرکه حنظل	۳۷۷/۸ ± ۱۵۷	۳۳۸/۳ ± ٤۰/۵	۰/۰۳۱
۵	دوز mg/kg ۱۰ گلی بن کلامید	۳۳۵/۷ ± ۸٤/۱	۲۵۰/۷ ±۱۳۰/۵	۰/۰۱۵

بحث

نتایج نشان می‌دهند که عصاره‌های فرآوری نشده و فرآوری شده با آب نمک و سرکه حنظل در دوز یکسان (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مانند گلی بن کلامید به طور معنی‌دار در مقایسه با کنترل باعث کاهش سطح خونی گلوکز ناشتا می‌شوند. همچنین، تفاوت معنی‌داری بین سطوح خونی گلوکز ناشتای سه گروه عصاره با یکدیگر پس از ۱ ماه مصرف عصاره‌ها وجود ندارد (p > ۰/۰۵). بنابراین، اثربخشی (efficacy) عصاره‌های فرآوری نشده و فرآوری شده از نظر کاهش سطح گلوکز خون با هم برابر و فرآوری، تأثیری بر اثربخشی حنظل در کاهش گلوکز خون ندارد. اثر ضدافزایش گلوکز خون عصاره‌های حنظل در مطالعه کنونی، با مطالعات گذشته درباره اثر ضددیابتی آن و همچنین استفاده از آن در طب سنتی برای درمان دیابت مطابقت دارد [۹ - ٦]. اینکه عصاره‌های فرآوری نشده و فرآوری شده در دوزهای کمتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اثر کاهنده گلوکز خون در حیوان دیابتی ندارند و در دوزهای بزرگتر از ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث مرگ و میر می‌شوند نشان می‌دهد که فاصله دوزی که اثر مفید ایجاد می‌کند از دوز سمی کم است. به عبارت دیگر، شاخص درمانی (therapeutic index) یا حاشیه ایمنی (safety margin) عصاره‌های فرآوری شده و فرآوری نشده حنظل، کوچک است و این مشخصه داروهای پرعارضه و سمی است. همچنین، موادی که LD_{50} آنها بین ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم است، سمیت متوسطی دارند [۱۰]. با در نظر گرفتن LD_{50} به عنوان ملاک سمیت، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عصاره‌های فرآوری نشده و فرآوری شده حنظل دارای سمیت متوسطی هستند. از طرف دیگر، LD_{50} عصاره‌های فرآوری شده با هم برابر و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۲۵ درصد) بزرگتر از عصاره فرآوری نشده است. بنابراین، مطالعه کنونی اولین مطالعه‌ای است که نشان می‌دهد فرآوری با آب نمک یا سرکه می‌تواند ضمن حفظ اثر ضددیابتی باعث کاهش سمیت حنظل شود. در نتیجه، فرآوری حنظل با آب نمک یا سرکه در طب سنتی ایران، قابل توجیه به نظر می‌رسد. علت کاهش سمیت حنظل پس از فرآوری آن با آب نمک یا سرکه را نمی‌توان با مطالعه کنونی توجیه نمود و نیاز به بررسی دارد. احتمال دارد که فرآوری با آب نمک یا سرکه باعث کاهش مقدار مواد سمی یا پیدایش مواد جدیدی که اثرات مواد سمی را تا اندازه‌ای خنثی می‌کنند، شود. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری درباره اثرات فرآوری بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره و خواص فارماکولوژیک و سمیت حنظل انجام شود.

Downloaded from jmp.ir at 6:02 +0430 on Friday August 17th 2018

منابع

1. Shane-McWhorter L. Botanical dietary supplements and the treatment of diabetes: What is the evidence? *Curr. Diab. Rep.* 2005; 5: 391 - 8.

2. Zareba G, Serradell R, Castaner R, Davies SL, Prous J and Mealy N. Phytotherapies for diabetes. *Drugs Future.* 2005; 30: 1253 - 82.

3. Dey L, Attele AS and Yuan CS. Alternative therapies for type 2 diabetes. *Altern. Med. Rev.* 2002; 7: 45 - 58.

4. Gilbert MP and Pratley RE. Efficacy and safety of incretin-based therapies in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. Intern. Med.* 2009; 20: S309 - S318.

5. Marles R and Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine.* 1995; 2: 137 - 46.

6. Sebbagh N, Cruciani-Guglielmacci C, Quali F, Berthault MF, Rouch C, Sari DC and Magnan C. Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozocin-induced diabetes in rats. *Diabetes Metab.* 2009; 35: 178 - 84.

7. Abdel-Hassan IA, Abdel-Barry JA and Tariqh Mohammeda S. The hypoglycemic and anti-hyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 71: 3250330.

8. Fallah Huseini H, Darvishzadeh F, Heshmat R, Jafariazar Z, Raza M and Larijani B. The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. fruit in treatment of type II diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytother. Res.* 2009; 23: 1186 - 9.

9. Fleming T. PDR for Herbal Medicines. 1st ed. Medical Economics Company. USA. 1998, pp: 753 - 4.

10. Marquis JK. A Guide to General Toxicology. 2nd ed. Karger. Switzerland. 1989, pp: 196 - 8.

Downloaded from jmp.ir at 6:02 +0430 on Friday August 17th 2018