

Antidiabetic and Hepatoprotective Effects of Hydroalcoholic Extract of *Trifolium pratense* in Mice

Rahmatollah Parandin*

Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of
Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Apr. 5, 2019 - Accepted: Jan. 13, 2020)

بررسی اثرات ضد دیابتی و محافظت کبدی عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز در موش‌های کوچک آزمایشگاهی

رحمت‌اله پرندین*

استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۳)

Abstract

Recent reports have shown that some Plant Isoflavones have beneficial effects on diabetes and liver health in human and laboratory animals. The aim of this study was to administrate of hydroalcoholic extract of *Trifolium pratense* (red clover) as a plant rich in Isoflavones compounds and its effects on serum levels of glucose and liver enzymes (AST, ALT and ALP) in mice. In this experimental study, 42 male mice were divided into 6 groups of 7, including healthy control, diabetic without treatment (positive control), diabetic treated with glibenclamide groups, and three diabetic groups treated respectively with 250, 500 and 750 mg/kg of hydroalcoholic extract of red clover by gavage for 15 days. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin, 60 mg/kg. On the last day, serum glucose and Liver Enzymes (ALT, ALP and AST) levels were measured. The data were analyzed by SPSS statistical software and OneWay ANOVA test. The significant was shown with ($P < 0.05$). Doses of 500 mg/kg and 750 mg/kg of extract were significantly ($P < 0.001$) decreased serum glucose compared with positive control group. Assessment of liver enzymes shown that AST level in 750mg/kg group ($P < 0.001$), ALT level in 500 mg/kg ($P < 0.01$) and 750 mg/kg ($P < 0.001$) groups, and ALP level in 250 mg/kg ($P < 0.05$), 500 mg/kg ($P < 0.001$) and 750 mg/kg ($P < 0.001$) groups significantly decreased compared with positive control group. It seems that the red clover has anti-diabetic and hepatoprotective effects.

Keywords: Diabetes, liver, mice red, clover.

چکیده

گزارش‌های اخیر نشان داده‌اند که برخی از ایزوفلاون‌های گیاهی دارای اثرات سودمندی بر دیابت و سلامتی کبد در انسان و حیوانات آزمایشگاهی هستند. هدف از این تحقیق، تجویز عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به‌عنوان یک گیاه سرشار از ترکیبات ایزوفلاونی و اثرات آن بر سطوح سرمی قند و آنزیم‌های کبدی اسپاراتات ترانس آمیناز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در موش‌های سوری نر بود. در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۲ سر موش سوری نر به ۶ گروه ۷ تایی شامل گروه‌های کنترل سالم، دیابتی شده بدون درمان (کنترل مثبت)، دیابتی شده تحت درمان با گلی‌بنکلامید و سه گروه دیابتی تحت درمان با عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به‌ترتیب با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از راه گاوژ برای مدت ۱۵ روز طبقه‌بندی شدند. دیابت با تزریق داخل صفاقی ۶۰ mg/kg استرپتوزوتوسین انجام شد. در روز آخر سطوح سرمی گلوکز، و آنزیم‌های ALT، AST و ALP اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معناداری $p < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند. دوزهای ۵۰۰ mg/kg و ۷۵۰ mg/kg عصاره به‌طور معناداری ($p < 0.001$) قند خون را در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش دادند. در بررسی آنزیم‌های کبدی، سطح AST در گروه ۷۵۰ mg/kg ($p < 0.001$)، سطح ALT در گروه‌های ۵۰۰ mg/kg ($p < 0.01$) و ۷۵۰ mg/kg ($p < 0.001$) و سطح ALP در گروه‌های ۲۵۰ mg/kg ($p < 0.05$)، ۵۰۰ mg/kg ($p < 0.001$) و ۷۵۰ mg/kg ($p < 0.001$) در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش یافت. این مطالعه نشان داد مصرف عصاره آبی-الکلی گیاه شبدر قرمز علاوه بر اثرات ضد دیابتی، دارای اثرات حفاظت کبدی نیز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، کبد، شبدر قرمز، موش سوری.

مقدمه

دیابت ملیتوس یک اختلال اندوکرینی متداول می‌باشد که در بسیاری از جوامع انسانی تبدیل به اپیدمی شده است. در حال حاضر حدود ۲۰۰ میلیون نفر در جهان به دیابت مبتلا بوده و به گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، احتمالاً این رقم در سال ۲۰۲۵ به حدود ۳۰۰ میلیون نفر افزایش خواهد یافت. این بیماری ناشی از ناتوانی لوزالمعده برای تولید انسولین یا عدم توانایی سیستم متابولیک بدن برای استفاده مناسب از تولید انسولین است. دلایل ایجاد این بیماری دقیقاً شناخته شده نیستند؛ با این حال، شیوع این بیماری به میزان زیادی در نتیجه افزایش تعداد سالمندان، تغییر در عادات غذایی، چاقی و بی‌تحریکی افزایش می‌یابد. از آنجاکه بدن انسان در طی بیماری دیابت به‌طور مناسبی قادر به متابولیسم قند نیست، اولین علامت بیماری افزایش قند خون یا هیپرگلیسمی است (Rahmatullah et al., 2012). در دیابت علاوه بر افزایش قند خون، عوارض دیگری از قبیل کتواسیدوز، رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی، عوارض عروق کرونر، سکته مغزی و به‌ویژه اختلالات کبدی نیز مشاهده می‌شوند (Sonksen & Sonksen, 2000). در این میان کبد به‌عنوان یکی از اهداف مهم برای هورمون انسولین و سایر هورمون‌های تنظیم‌کننده قند خون از جمله گلوکاگن به شمار می‌رود. در افراد دیابتی، مقاومت به انسولین، افزایش اسیدهای چرب کبد و در نتیجه انباشته شدن چربی در سلول‌های کبدی می‌تواند منجر به بروز کبد چرب و در نتیجه مرگ سلول‌های کبدی شود (Jamali R & Jamali A, 2010). میزان شیوع سرطان کبد در افراد مبتلا به دیابت ۴ برابر سایر افراد طبیعی است. بنابراین با کنترل قند خون و درمان افراد دیابتی می‌توان از بروز اختلالات کبدی جلوگیری کرد (Androli et al., 2007; Loguercio & Federico, 2003). به‌طور معمول جهت درمان دیابت و اختلالات قند از داروهای شیمیایی مختلفی استفاده می‌گردد که دارای

عوارض متعددی از جمله هیپوگلیسمی، سردرد، تهوع، زخم معده، واکنش‌های حساسیتی، تغییرات وزن و غیره می‌باشند (Chaudhury et al., 2017)؛ لذا در کنار داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی می‌تواند اثرات جانبی کمتر و هزینه کمتری داشته باشد. مطالعات آزمایشگاهی و بالینی مختلف در سال‌های گذشته اثرات سودمند برخی گیاهان دارویی از جمله سیر، خیار، پیاز، شنبلیله، خار مریم، چای سبز، اسپرزه و غیره را نشان داده‌اند. پیش از کشف داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی و درمان سنتی در دیابت بسیار متداول بوده است (Zangeneh et al., 2018).

شیدر قرمز (*Trifolium pratense*) یک گیاه علفی و چند ساله می‌باشد که استفاده از آن در طب سنتی به‌عنوان خلط آور، ضد عفونی‌کننده، ضد درد، ضد سرفه، تب بر، بهبود دهنده ذات الریه و مننژیت توصیه شده است. همچنین استفاده آن در درمان بیماری‌های پوستی، ریه و اختلالات سیستم عصبی و باروری گزارش شده است. آنالیز شیمیایی حاصل از مطالعات مختلف نشان داده‌اند که شیدر قرمز غنی از ترکیبات پلی‌فنولی از جمله ایزوفلاونوئیدها و فلاونوئیدها می‌باشد. بعلاوه حضور مشتقات کومارین، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، ساپونین، روغن‌های فرار، ویتامین‌ها و مواد معدنی در این گیاه نیز گزارش شده است (Tundis et al., 2015; Sabudak et al., 2006; Azad Bakht, 2009). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که مصرف طولانی مدت رژیم‌های غذایی غنی از ترکیبات پلی‌فنولی گیاهی دارای اثرات آنتی‌دیابت و ضد چاقی می‌باشند (Kooti et al., 2016; Bindu et al., 2019).

از دیگر خواص این گیاه در درمان گرگرفتگی به‌ویژه در زنان یائسه، کاهش‌دهنده کلسترول خون، بهبوددهنده سیستم گردش خون و جلوگیری‌کننده از شکل‌گیری لخته‌های خون و پلاک‌های سرخرگی و همینطور در پیشگیری از سرطان خوش خیم پروستات می‌توان اشاره کرد. همچنین تابه‌حال عوارض خاصی از این گیاه

حیوانات

۴۲ سر موش سوری نر از نژاد Balb/c با وزن تقریبی ۲۸-۳۴ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تهیه شدند. در طول مدت انجام آزمایش موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد و میزان رطوبت ۵۵-۵۰ درصد، در قفس‌های پلاستیکی نگهداری شدند. در طول آزمایش، غذا و آب کافی در اختیار آنها قرار گرفت. کلیه مراحل انجام آزمایش مطابق آیین نامه کمیته اخلاق زیستی دانشگاه پیام نور انجام گرفت.

القای دیابت

القای دیابت با تجویز درون صفاقی استرپتوزوسین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انجام شد. سطح قند خون بعد از سه روز توسط دستگاه گلوکومتر (AGM2200) اندازه‌گیری شده و موش‌های با قند خون بیشتر از ۲۰۰ واحد به‌عنوان دیابتی گروه‌بندی شدند.

گروه‌بندی و تیمار

در مجموع موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۷ تایی بصورت زیر تقسیم شدند. گروه ۱: موش‌های سالم و بدون درمان، گروه ۲: موش‌های دیابتی شده و بدون درمان (کنترل مثبت)، گروه ۳: موش‌های دیابتی و تحت درمان با داروی گلی‌بنکلامید برای مدت ۱۵ روز با روش گاواژ، گروه‌های ۴، ۵ و ۶: موش‌های دیابتی و به ترتیب تحت درمان با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز به صورت گاواژ و برای مدت ۱۵ روز.

مطالعات بیوشیمیایی

در اولین روز پس از آخرین تیمار دارویی موش‌ها با کتامین و زایلازین عمیقاً بی‌هوش شده و سپس حیوانات تشریح شده و بلافاصله از بطن چپ خون‌گیری به عمل آمد. سطح قند خون و آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز،

گزارش نشده است (Tundis *et al.*, 2015; Sabudak *et al.*, 2009; Azad Bakht, 2006). اثرات سودمند این گیاه بر فشار خون و عملکرد اندوتلیوم در زنان منوپوز دیابتی نوع ۲ نیز گزارش شده است (Howes *et al.*, 2003).

با توجه به فواید فراوان شبدر قرمز و از آنجایی که اطلاع کمی در رابطه با با تاثیر شبدر قرمز بر دیابت و کبد در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد، در مطالعه حاضر این اثرات بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی-الکلی

جهت تهیه عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز، ابتدا گیاه از مزارع اطراف کرمانشاه جمع‌آوری شد و پس از تایید توسط متخصص بیوسیستماتیک گیاهی دانشگاه پیام نور استان کرمانشاه (کد هرباریومی: ۱۳۹۶/۱۱)، برگ و سر شاخه‌های آن جدا شده و در سایه خشک گردید. در مرحله بعد پس از آسیاب کردن با استفاده از آسیاب برقی به صورت پودر درآمد. مقدار ۲۰ گرم پودر حاصل در ارلن درب دار ریخته و سپس مقدار ۲۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه گردید و برای مدت ۴۸ ساعت همراه با تکان دادن ظرف در چند نوبت نگهداری گردید. پس از این مدت با کمک قیف شیشه‌ای و کاغذ واتمن نمره ۲ صاف شد. در مرحله بعد محلول صاف شده را در بالن ریخته و با کمک دستگاه روتاری در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد با دور متوسط قرار گرفت. بعد از خروج حلال مایع غلیظ روی یک شیشه تمیز و خشک پهن گردید تا خشک شود. پس از خشک‌شدن پودر حاصله جمع‌آوری گردید و از پودر حاصل برای تهیه دوزهای مطالعه حاضر بهره‌برداری گردید. همین‌طور جهت تهیه محلول‌ها از نرمال سالین ۰/۹٪ استفاده شد. دوزهای مورد استفاده ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز براساس تحقیق Rabiei *et al.* (2018) انتخاب شدند.

آلانین آمینو ترانسفراز و آلکالین فسفاتاز توسط کیت‌های مربوطه (پارس آزمون) با استفاده از دستگاه اتوآنالایزر (بیوتکنیکا، ایتالیا) ثبت گردید.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های خام جمع‌آوری شده در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و آنالیز واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین با آزمون توکی با سطح احتمال $P < 0/05$ انجام شد.

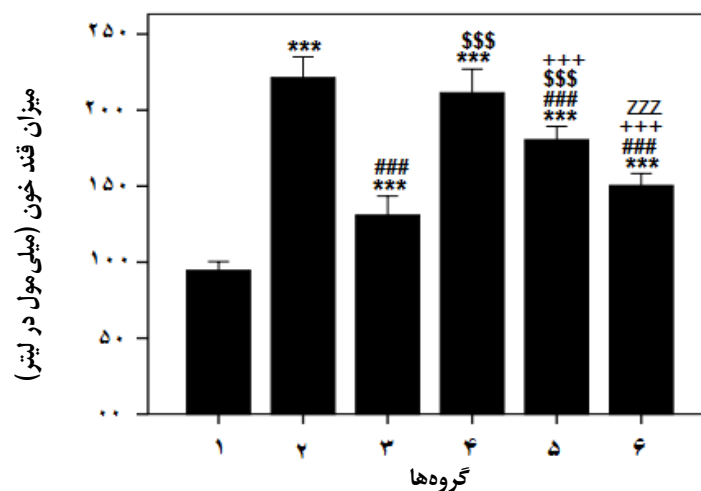
نتایج

نتایج حاصل از بررسی قند خون

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، سطوح قند خون کلیه گروه‌های مورد مطالعه در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری ($P < 0/001$) افزایش داشت. سطح قند خون در گروه‌های دیابتی تحت درمان با گلی‌بنکلامید و گروه‌های دیابتی تحت درمان با دوزهای ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به‌طور معناداری ($P < 0/001$) کمتر از گروه دیابتی بدون درمان بود. سطح قند خون در گروه‌های دیابتی تحت درمان با دوزهای ۲۵۰ و

۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به‌طور معناداری ($P < 0/001$) بیشتر از گروه دیابتی تحت درمان با گلی‌بنکلامید بود. سطح قند خون در گروه‌های تحت درمان با دوزهای ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به‌طور معناداری ($P < 0/001$) کمتر از گروه عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. همین‌طور سطح قند خون در گروه ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به‌طور معناداری ($P < 0/001$) کمتر از گروه عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود.

نتایج حاصل از بررسی آنزیم‌آسپاراتات آمینوترانسفراز همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود، سطوح آسپاراتات آمینوترانسفراز گروه‌های دیابتی بدون درمان ($P < 0/001$)، دیابتی تحت درمان با گلی‌بنکلامید ($P < 0/05$) و گروه‌های دیابتی تحت درمان با دوزهای ۲۵۰ ($P < 0/01$) و ۵۰۰ ($P < 0/05$) میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش داشتند.



نمودار ۱. اثر تجویز عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز بر میزان قند خون موش‌های سوری. (۱) گروه کنترل و سالم، (۲) گروه دیابتی بدون درمان (کنترل مثبت)، (۳) گروه دیابتی تحت درمان با گلی‌بنکلامید، (۴، ۵ و ۶) گروه‌های دیابتی و به ترتیب تحت درمان با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز. روش آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $p < 0/05$ انجام شد. *** ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه ۱، ### ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه ۲، \$\$\$ ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه ۳، +++ ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه ۴، ZZZ ($P < 0/001$) اختلاف معنادار با گروه ۵.

میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به طور معناداری ($P < 0.05$) کمتر از گروه عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز با دوز ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود.

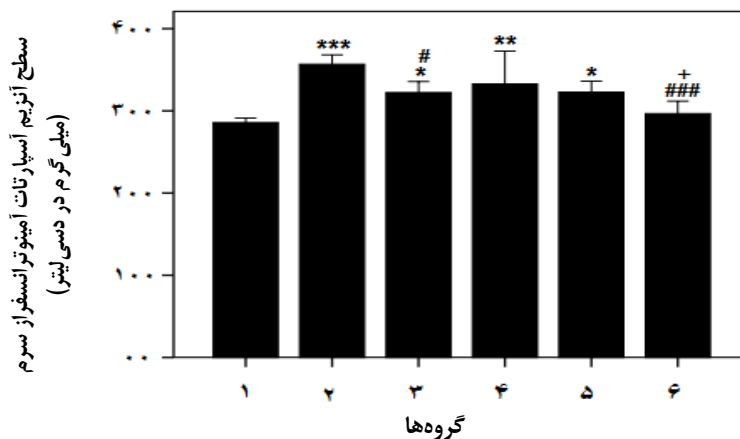
نتایج حاصل از بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز

همان طور که در نمودار ۴ مشاهده می شود، در مقایسه با گروه کنترل سطوح آلکالین فسفاتاز گروه دیابتی بدون درمان به طور معناداری ($P < 0.05$) افزایش داشت و برای گروه های دیابتی تحت درمان با دوزهای ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به طور معناداری ($P < 0.05$) کاهش داشت. گروه های داروی بنکلامید و ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان ندادند. سطح آلکالین فسفاتاز در گروه دیابتی تحت درمان گلی بنکلامید ($P < 0.001$) و گروه های دیابتی تحت درمان با دوزهای ۲۵۰ ($P < 0.01$) و ۵۰۰ ($P < 0.001$) و ۷۵۰ ($P < 0.001$) میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به طور معناداری کمتر از گروه دیابتی بدون درمان بود. مقایسه گروه های دیابتی تحت درمان با دوزهای متفاوت عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز تفاوت معناداری را با یکدیگر و با گروه دیابتی تحت درمان با داروی گلی بنکلامید نشان ندادند.

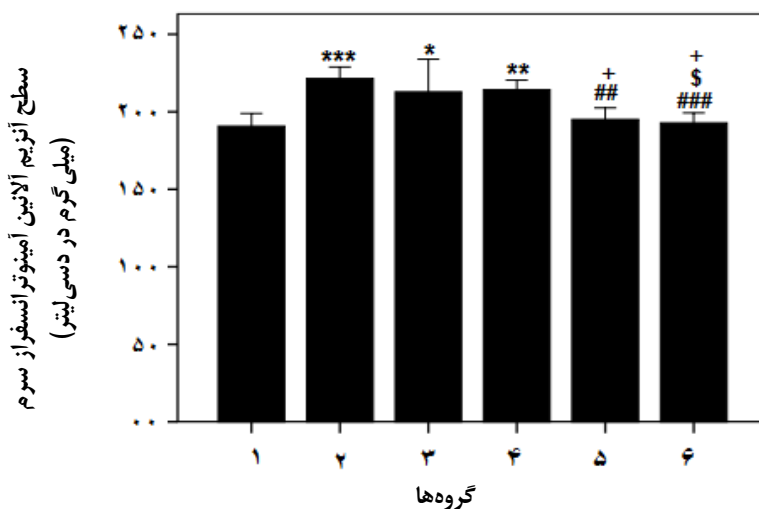
سطح آسپاراتات آمینوترانسفراز در گروه های دیابتی تحت درمان با گلی بنکلامید ($P < 0.05$) و دیابتی تحت درمان با دوز ۷۵۰ ($P < 0.001$) میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به طور معناداری کمتر از گروه دیابتی بدون درمان بود. سطح آسپاراتات آمینوترانسفراز در گروه ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به طور معناداری ($P < 0.05$) کمتر از گروه عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بود.

نتایج حاصل از بررسی آنزیم آلانین آمینوترانسفراز

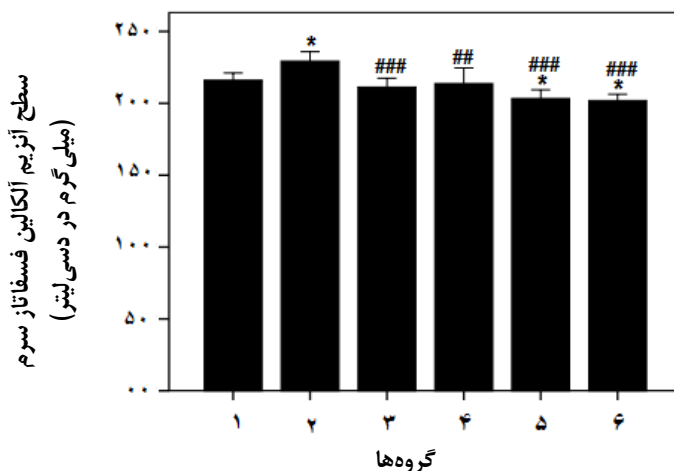
همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می شود، سطوح آلانین آمینوترانسفراز گروه های دیابتی بدون درمان ($P < 0.001$)، دیابتی تحت درمان با گلی بنکلامید ($P < 0.05$) و دیابتی تحت درمان با دوز ۲۵۰ ($P < 0.01$) میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری افزایش داشتند. سطح آلانین آمینوترانسفراز در گروه های دیابتی تحت درمان با دوزهای ۵۰۰ ($P < 0.01$) و ۷۵۰ ($P < 0.001$) میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به طور معناداری کمتر از گروه دیابتی بدون درمان بود. سطح آلانین آمینوترانسفراز در گروه های ۵۰۰ و ۷۵۰



نمودار ۲. اثر تجویز عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز بر سطح آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز خون موش های سوری. (۱) گروه کنترل و سالم، (۲) گروه دیابتی بدون درمان (کنترل مثبت)، (۳) گروه دیابتی تحت درمان با گلی بنکلامید، (۴، ۵ و ۶) گروه های دیابتی و به ترتیب تحت درمان با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز. روش آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $P < 0.05$ انجام شد. * ($P < 0.05$)، ** ($P < 0.01$) و *** ($P < 0.001$) و اختلاف معنادار با گروه ۱، # ($P < 0.05$) و ### ($P < 0.001$) اختلاف معنادار با گروه ۲، + ($P < 0.05$) اختلاف معنادار با گروه ۴.



نمودار ۳. اثر تجویز عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز بر سطح آنزیم آلانین آمینوترانسفراز خون موش‌های سوری. (۱) گروه کنترل و سالم، (۲) گروه دیابتی بدون درمان (کنترل مثبت)، (۳) گروه دیابتی تحت درمان با گلی‌بنکلامید، (۴، ۵ و ۶) گروه‌های دیابتی و به ترتیب تحت درمان با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز. روش آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $P < 0.05$ انجام شد. * ($P < 0.05$)، ** ($P < 0.01$) و *** ($P < 0.001$) اختلاف معنادار با گروه ۱، ## ($P < 0.01$) و ### ($P < 0.001$) اختلاف معنادار با گروه ۲، \$ ($P < 0.05$) اختلاف معنادار با گروه ۳، + ($P < 0.05$) اختلاف معنادار با گروه ۴.



نمودار ۴. اثر تجویز عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز بر سطح آنزیم آلکالین ترانسفراز خون موش‌های سوری. (۱) گروه کنترل و سالم، (۲) گروه دیابتی بدون درمان (کنترل مثبت)، (۳) گروه دیابتی تحت درمان با گلی‌بنکلامید، (۴، ۵ و ۶) گروه‌های دیابتی و به ترتیب تحت درمان با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز. روش آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی با سطح احتمال $P < 0.05$ انجام شد. * ($P < 0.05$) اختلاف معنادار با گروه ۱، ## ($P < 0.01$) و ### ($P < 0.001$) اختلاف معنادار با گروه ۲.

بحث و نتیجه‌گیری

کیلوگرم عصاره دارای بیشترین اثر کاهشنده قند خون می‌باشد. تحقیقات نشان داده‌اند که برخی از گیاهان دارویی اثرات سودمندی بر دیابت داشته و توانایی کاهش قند خون را دارند (Rahmatullah et al., 2012; Kooti et al., 2016). تعدادی از این

در بررسی سطح قند خون مشخص شد که عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز، قند خون در موش‌های دیابتی را به‌طور معناداری کاهش می‌دهد که به‌نظر می‌رسد این اثر وابسته به دوز باشد و دوز ۷۵۰ میلی‌گرم بر

مربوطه تحت مسمومیت با استرپتوزوتویسین را دارا می‌باشد. در مطالعه حاضر علاوه بر مشاهده اثرات آنتی‌دیابتیک شبدر قرمز، سطوح آنزیم‌های کبدی AST، ALT و ALP نیز کاهش یافت که در مطالعات قبلی بررسی نشده نبود.

کاهش قند خون و آنزیم‌های کبدی در موش‌های دیابتی حاضر ممکن است به علت ایزوفلاون‌های موجود در شبدر قرمز باشد که نیاز به مطالعات آینده دارد. یکی از مکانیسم‌های عمده که برای اثرات ضد دیابتی ایزوفلاون‌ها پیشنهاد شده است فعال‌سازی گیرنده‌های فعال‌کننده تکثیر پروکسی‌زوم (PPARs) می‌باشد که گیرنده‌های هسته‌ای هستند که در عملکرد انسولین و هموستازی لیپید سلولی نقش دارند (Kota *et al.*, 2005). از لیگاندهای PPARs نوع گاما به‌عنوان داروهای درمان دیابت نوع ۲ در کلینیک استفاده می‌گردد (Shen *et al.*, 2006). مطالعات *in vitro* نشان داده‌اند بیوکائین‌آ، جنیستین، فورمونوتین به‌عنوان آگونیست PPARs نوع گاما عمل می‌کنند (Shen *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2010;) (Qiu *et al.*, 2012).

یکی دیگر از مکانیسم‌های پیشنهادی اثرات ضد دیابتی ایزوفلاون‌ها توانایی فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ پروتئین کیناز وابسته به AMPK و catenin می‌باشد. پیشنهاد شده که فعال‌کننده‌های کیناز این مسیرها ممکن است به‌عنوان عوامل مؤثر برای درمان دیابت نوع ۲، چاقی و سندروم متابولیک عمل کنند (Zhao *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010). در مطالعه‌ای اثرات فعال‌کنندگی مسیر AMPK و پیام‌رسانی کاتنین (Catenin) توسط فورمونوتین نشان داده شده است (Gautam *et al.*, 2017).

آنزیم‌های کبدی AST، ALT و ALP آنزیم‌هایی هستند که به‌عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی باارزشی در اختلالات کبدی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. این آنزیم‌ها در حالت عادی در سلول‌های کبدی ساخته شده و در زمان آسیب به هپاتوسیت‌ها وارد خون

مطالعات نشان داده‌اند که عصاره‌های گیاهی با کاهش مقاومت انسولین در بدن و با افزایش تعداد گیرنده‌های انسولین در گلبول‌های قرمز و بافت‌های محیطی بدن میزان قند خون را تنظیم می‌کنند (Hagh-Nazari *et al.*, 2017). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که مصرف طولانی‌مدت رژیم‌های غذایی غنی از ترکیبات پلی‌فنولی گیاهی به‌ویژه ایزوفلاون‌ها و فلاونوئیدها موجب بهبود مناسب اختلالات مزمن از جمله دیابت و چاقی هستند (Pandey & Rizvi, 2009; Usui, 2006; Bhatena & Velasquez, 2002). مطالعات قبلی نشان داده شده که ایزوفلاون‌های مشتق از گیاه سویا دارای اثرات سودمندی در کاهش قند خون و بهبود پروفایل لیپیدی موش‌های دیابتی هستند (Lee, 2006; Mezei *et al.*, 2003). در مطالعه بیماران دیابتی نوع ۲ نیز اثرات مفید ایزوفلاون‌های سویا گزارش شده است (Jayagopal *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). ایزوفلاون‌های سویا شامل جنیستین و دایدزین می‌باشد، درحالی‌که شبدر قرمز یک گیاه غنی از ایزوفلاون‌های مختلف می‌باشد که مهمترین آنها شامل بیوکائین‌آ، جنیستین، فورمونوتین و دایدزین می‌باشد. در مطالعه Azizi *et al.* (2014) تجویز گاوآذ بیوکائین‌آ موجب کاهش قند خون و هموگلوبین گلیکوزیله موش‌های دیابتی گردید. همین‌طور اثرات سودمند جنیستین و دایدزین در کاهش قند خون موش‌های هیپرگلیسمیک نشان داده شده است (Fu *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2013; Ae *et al.*, 2013). مطالعه Qiu *et al.* (2012) نشان داده که عصاره شبدر قرمز دارای اثرات ضد دیابتی و کاهش‌دهنده سطوح کلسترول و تری‌گلیسرید در خون و کبد موش‌های دیابتیک db/db (موش‌های با حذف گیرنده لپتین) می‌باشد. در مطالعه Khazaei & Pazhouhi (2018) نشان داده شده که عصاره هیدروالکلی شبدر قرمز علاوه بر اثرات آنتی‌دیابتیک، پتانسیل محافظت از سلول‌های بتای لوزالمعده در لاین‌های سلولی

Karale & Kamath,) و ALP و ALT، AST گردید (2017). مطالعات نشان داده‌اند که ترکیبات پلی‌فنولی گیاهی در غلظت‌های مناسب از سلول علیه مسمومیت‌های سلولی، شکسته شدن DNA و آپوپتوز سلولی توسط پراکسید هیدروژنی محافظت می‌کنند (Watjen *et al.*, 2005). بنابراین وجود ترکیبات قابل توجه فنولی از جمله جنیستین، بیوکائین آ و دایدزین ممکن است دلیل اثرات محافظت کبدی شبدر قرمز باشد که نیاز به مطالعات بعدی دارد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که گاواژ عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز دارای اثرات ضد دیابتی و محافظت کبدی در موش می‌باشد. در مجموع عصاره آبی-الکلی شبدر قرمز به‌ویژه در دوز ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قادر به کاهش قند خون و آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در موش‌های کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بود که این اثرات ممکن است مربوط به ترکیبات فنولی موجود در این گیاه باشد.

سپاسگزاری

از حوزه محترم معاونت پژوهشی دانشگاه پیام نور به خاطر تأمین مالی این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

می‌شوند و سطح آنها در خون افزایش می‌یابد (Kim *et al.*, 2008; Romeo *et al.*, 2010). عصاره شبدر قرمز موجب کاهش آنزیم‌های کبدی در خون موش‌های دیابتی تحت مسمومیت با استرپتوزوتوسین شد که به‌نظر می‌رسد بیشترین اثر مربوط به دوز بالاتر عصاره یعنی ۷۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باشد که نتایج آن قابل قیاس با داروی گلی‌بنکلامید می‌باشد که می‌تواند نشانه پتانسیل گیاه در دوز بالاتر در کاهش آسیب‌های کبدی ناشی از استرپتوزوتوسین باشد. در بررسی مطالعات قبلی اثرات شبدر قرمز بر آنزیم‌های کبدی گزارش نشده است. در مطالعه‌ای نشان داده شده که گاواژ بیوکائین آ سبب کاهش معناداری در میزان سرمی آنزیم‌های ALT، AST و ALP در موش‌های دیابتی تحت مسمومیت با استرپتوزوتوسین شده است (Azizi *et al.*, 2014). در مطالعات دیگری نشان داده شده است که جنیستین آسیب کبدی و سطوح آنزیم‌های کبدی در موش‌های تحت مسمومیت با مورفین و تتراکلریدکربن را بهبود می‌دهد (Salahshoor *et al.*, 2018; Kuzu *et al.*, 2007). همین‌طور در مطالعه‌ای تزریق داخل صفاقی دایدزین به موش‌های تحت مسمومیت با داروی Cisplatin موجب کاهش سطوح سرمی آنزیم‌های

REFERENCES

- Ae Park, S.; Choi, M.S.; Cho, S.Y.; Seo, J.S.; Jung, U.J.; Kim, M.J.; et al. (2006). Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice. *Life Sci*; 79(12): 1207-13.
- Androli, T.; Carpenter, C.; Griggs, R.; Benjamin, I. (2007). Diseases of the Liver and Biliary System. in: Cecil's Essentials of Medicine. 7th ed. USA: WB Saunders Company.
- Azad Bakht, M. (2006). Phytoestrogens. *Journal of Medical Plants*; 6(21): 1-10.
- Azizi, R.; Goodarzi, M.T.; Salemi, Z. (2014). Protective effect of biochanin A on the hepatic and renal function of diabetic rats. *Daneshvar Medicine*; 21(109): 7-16.
- Bathena, S.J.; Velasquez, M.T. (2002). Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr*; 76: 1191-1201.
- Bindu, J.; Narendhirakannan, R.T. (2019). Role of medicinal plants in the management of diabetes mellitus: a review. *Biotech*; 9(1): 4.
- Chaudhury, A.; Duvoor, C.; Reddy Dendi, V.S.; Kraleti, S.; Chada, A.; Ravilla, R.; et al. (2017). Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 8: 6.

- Choi, M.S.; Jung, U.J.; Yeo, J.; Kim, M.J.; Lee, M.K. (2008). Genistein and daidzein prevent diabetes onset by elevating insulin level and altering hepatic gluconeogenic and lipogenic enzyme activities in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Res Rev*; 24(1): 74-81.
- Fu, Z.; Gilbert, E.R.; Pfeiffer, L.; Zhang, Y.; Fu, Y.; Liu, D. (2012). Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab*; 37(3): 480-8.
- Gautam, J.; Khedgikar, V.; Kushwaha, P.; Choudhary, D.; Nagar, G.K.; Dev, K.; et al. (2017). Formononetin, an isoflavone, activates AMP-activated protein kinase/ β -catenin signalling to inhibit adipogenesis and rescues C57BL/6 mice from high-fat diet-induced obesity and bone loss. *Br J Nutr*; 117(5): 645-61.
- Hagh-Nazari, L.; Goodarzi, N.; Zangeneh, M.M.; Zamganeh, A.; Tahvilin, R.; Moradi, R. (2017). Stereological study of kidney in streptozotocin-induced diabetic mice treated with ethanolic extract of *Stevia rebaudiana* (bitter fraction). *Comp Clin Pathol*; 26: 455-63.
- Howes, J.B.; Tran, D.; Brillante, D.; Howes, L.G. (2003). Effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on ambulatory blood pressure and endothelial function in postmenopausal type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*; 5(5): 325-32.
- Jamali, R.; Jamali, A. (2010). Non-alcoholic fatty liver disease. *Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences*; 14(2): 169-81.
- Jayagopal, V.; Albertazzi, P.; Kilpatrick, E.S.; et al. (2002). Beneficial effects of soy phytoestrogen intake in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Diabetes Care*; 25: 1709-14.
- Karale, S.; Kamath, J.V. (2017). Effect of daidzein on cisplatin-induced hematotoxicity and hepatotoxicity in experimental rats. *Indian J Pharmacol*; 49(1): 49-54.
- Khazaei M, Pazhouhi M. Protective effect of hydroalcoholic extracts of *Trifolium pratense* L. on pancreatic β cell line (RIN-5F) against cytotoxicity of streptozotocin. *Res Pharm Sci*. 2018; 13(4): 324-31.
- Kim, W.; Flamm, S.; Bisceglie, A.D.; Bodenheimer, H. (2008). Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*; 47(4): 1363-70.
- Kooti, M.; Farokhipour, M.; Asadzadeh, Z.; Ashtary-Larky, D.; Asadi-Samani, M. (2016). The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electron Physician*; 8(1): 1832-42.
- Kota, B.P.; Huang, T.H.; Roufogalis, B.D. (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*; 51: 85-94.
- Kuzu, N.; Metin, K.; Dagli, A.F.; Akdemir, F.; Orhan, C.; Yalniz, M.; et al. (2007) Protective role of genistein in acute liver damage induced by carbon tetrachloride. *Mediators Inflamm*; 2007:36381.
- Lee, JS. (2006). Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*; 79: 1578-1584.
- Li, Z.; Hong, K.; Saltsman, P.; et al. (2005). Long-term efficacy of soy-based meal replacements vs an individualized diet plan in obese type II DM patients: relative effects on weight loss, metabolic parameters, and C-reactive protein. *Eur J Clin Nutr*; 59: 411-418.
- Loguercio, C.; Federico, A. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med*; 34(1): 1-10.
- Mezei, O.; Banz, W.J.; Steger, R.W.; Peluso, M.R.; Winters, T.A.; Shay, N. (2003). Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr*; 133: 1238-1243.

- Mueller, M.; Hobiger, S.; Jungbauer, A. (2010). Red clover extract: a source for substances that activate peroxisome proliferator-activated receptor alpha and ameliorate the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Menopause*; 17: 379-387.
- Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev*; 2: 270-278.
- Qiu, L.; Chen, T.; Zhong, F.; Hong, Y.; Chen, L.; Ye, H. (2012). Red clover extract exerts antidiabetic and hypolipidemic effects in db/db mice. *Exp Ther Med*; 4(4): 699-704.
- Qiu, L.; Lin, B.; Lin, Z.; Lin, Y.; Lin, M.; Yang, X. (2012). Biochanin A ameliorates the cytokine secretion profile of lipopolysaccharide-stimulated macrophages by a PPAR γ -dependent pathway. *Mol Med Report*; 5: 217-22.
- Rabiei, Z.; Movahedi, E.; Rafieian-Kopaei, M.; Lorigooini, Z. (2018). Antidepressant effects of *Trifolium pratense* hydroalcoholic extract in mice. *J Physiol Pharmacol*; 2(1): 33-24.
- Rahmatullah, M.; Azam, M.N.; Khatun, Z.; Seraj, S.; Islam, F.; Rahman, M.A. et al. (2012). Medicinal plants used for treatment of diabetes by the Marakh sect of the Garo tribe living in Mymensingh district, Bangladesh. *Afr J Tradit Complement Altern Med*; 9(3): 380-5.
- Romeo, S.; Sentinelli, F.; Dash, S.; Yeo, G.; Savage, D.; Leonetti, F.; et al. (2010). Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *International journal of obesity*; 34(1): 190-4.
- Sabudak, T.; Guler, N. (2009). *Trifolium L.* a review on its phytochemical and pharmacological profile. *Phytother Res*; 23(3): 439-46.
- Salahshoor, M.R.; Roshankhah, S.; Hosseni, P.; Jalili, C. (2018). Genistein Improves Liver Damage in Male Mice Exposed to Morphine. *Chin Med J (Engl)*; 131(13): 1598-04.
- Shen, P.; Liu, M.H.; Ng, T.Y.; Chan, Y.H.; Yong, E.L. (2006). Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPAR α , PPAR γ , and adipocyte differentiation in vitro. *J Nutr*; 136: 899-905.
- Sonksen, P.; Sonksen, J.; (2000). Insulin: understanding its action in health and disease. *Brit J Anaesth*; 85(1): 69-79.
- Tundis, R.; Marrelli, M.; Conforti, F.; Concetta Tenuta, M.; Bonesi, M.; Menichini, F.; et al. (2015). *Trifolium pratense* and *T. repens* (Leguminosae): Edible Flower Extracts as Functional Ingredients. *Foods*; 4(3): 338-48.
- Usui, T. (2006). Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J*; 53: 7-20.
- Watjen, W.; Michels, G.; Steffan, B.; Niering, P.; Chovolou, Y.; Kampkotter, A.; et al. (2005). Low concentrations of flavonoids is protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *The Journal of Nutrition*; 135(3): 525-31.
- Zangeneh, M.M.; Goodarzi, N.; Zangeneh, A. (2018). Evaluation of Antidiabetic and hepatoprotective effects of aquatic extract of *Stevia rebaudiana* leaves (sweet fraction) in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Shahid Sadoughi Uni Med Sci*; 26(4): 319-29.
- Zhao, J.; Yue, W.; Zhu, M.J.; et al. (2010). AMP-activated protein kinase (AMPK) cross-talks with canonical Wnt signaling via phosphorylation of beta-catenin at Ser 552. *Biochem Biophys Res Commun*; 395: 146-51.
- Zhao, J.X.; Yue, W.F.; Zhu, M.J.; et al. (2011). AMP-activated protein kinase regulates beta-catenin transcription via histone deacetylase 5. *J Biol Chem*; 286: 16426-434.