

Hypoglycemic and Nephroprotective Effects of Aqueous Extract of *Stevia rebaudiana* (Sweet Fraction) in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice

Zangeneh MM¹, Goodarzi N*¹, Zangeneh A¹, Najafi F², Tahvilian R³

1. Department of Basic and Pathobiological Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

2. Department of Dermatology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

3. Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

*Corresponding author. Tel: 08338322599, Fax: 08338320041, E-mail: n.goodarzi@razi.ac.ir

Received: May 20, 2017 Accepted: Nov 21, 2017

ABSTRACT

Background & objectives: Considering the prevalence of diabetes and importance of its prevention, control and treatment, using low-calorie natural sweetener is necessary. Hepatoprotective and antidiabetic properties of the aqueous extract of *Stevia rebaudiana* were assessed in the present study.

Methods: In this study, 35 mature male mice were divided into 5 groups. Diabetes was induced by administration of 60 mg/kg of streptozotocin intraperitoneally. The negative control group received normal saline and treatment groups received glibenclamide with 0.5 mg/kg and 200 and 400 µg/kg of aqueous extract of *S. rebaudiana* through gavage for 15 days, respectively. Also, one group was considered as positive control (as non-treated diabetic). On the last day, the blood glucose levels of samples were measured. After periodic acid Schiff (PAS) staining, 5µm of sections were used for stereological analysis.

Results: The blood glucose level was decreased ($p<0.05$) significantly in aqueous extract-treated groups compared to the untreated diabetic mice. The weight and volume of kidneys, cortex, medulla, proximal and distal tubules, collecting ducts, loop of henle, interstitial tissues, vessels and length of renal tubules decreased significantly ($p<0.05$) after treatment with aqueous extract of *S. rebaudiana* ($p<0.05$). The number and volume of glomeruli restored toward normal levels with high doses of *S. rebaudiana*.

Conclusion: According to the obtained results, aqueous extract of *S. rebaudiana* (sweet fraction) can regulate the blood glucose levels and inhibit diabetes-induced renal damages. It seems that *S. rebaudiana* can be used as an antidiabetic and nephroprotective supplement.

Keywords: *Stevia rebaudiana*; Diabetes; Kidney; Mice

اثرات هیپوگلیسمیک و حفاظت کلیوی عصاره آبی گیاه استویا ربادیانا (قسمت شیرین) در موش‌های سوری دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

محمد مهدی زنگنه^۱، نادر گودرزی^{۱*}، اکرم زنگنه^۱، فریبا نجفی^۲، رضا تحویلان^۳

۱. گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲. گروه پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

* نویسنده مسؤل. تلفن: ۰۸۳ ۳۸۳۲۵۹۹ فاکس: ۰۸۳ ۳۸۳۲۰۰۴۱ پست الکترونیک: n.goodarzi@razi.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به شیوع روزافزون بیماری دیابت و اهمیت پیشگیری، کنترل و درمان آن، استفاده از شیرین کننده‌های کم کالری و طبیعی ضروری است. در مطالعه حاضر، خصوصیات حفاظت کلیوی و ضد دیابتی عصاره آبی بخش شیرین گیاه استویا ربادیانا ارزیابی شد.

روش کار: در این مطالعه ۳۵ سر موش سوری نر بالغ به طور تصادفی به پنج گروه هفت تایی تقسیم شدند. دیابت با دوز ۶۰ mg/kg استرپتوزوتوسین به صورت داخل صفاقی القا شد. گروه کنترل منفی نرمال سالین و گروه‌های تیمار به ترتیب ۵ mg/kg، ۲۰۰ g/kg و ۴۰۰ g/kg عصاره آبی استویا ربادیانا را به مدت ۱۵ روز دریافت کردند. یک گروه نیز به عنوان کنترل مثبت (دیابتی تیمار نشده) در نظر گرفته شد. در روز پایان، سطوح سرمی گلوکز خون اندازه‌گیری شد. مقاطع پنج میکرونی بافت کلیه پس از رنگ آمیزی به روش پریودیک اسید شیف (PAS) برای بررسی استرولوژیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: سطوح افزایش یافته گلوکز خون در گروه‌های تیمار شده با عصاره آبی استویا ربادیانا نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). وزن کلیه، حجم کلیه، کورتکس، لوله‌های پروکسیمال و دیستال، مجاری جمع‌کننده، قوس هنله، بافت‌های بینابینی و عروق و طول لوله‌های کلیوی پس از تیمار با دوزهای عصاره استویا ربادیانا به صورت معناداری کاهش یافت ($p < 0.05$). حجم و تعداد گلومرول‌ها با دوز بالای عصاره استویا به مقادیر طبیعی نزدیک شد. **نتیجه‌گیری:** طبق نتایج بدست آمده، عصاره آبی بخش شیرین گیاه استویا ربادیانا می‌تواند سطح قند را تنظیم نموده و از آسیب‌های کلیوی ناشی از دیابت پیشگیری نماید. به نظر می‌رسد بتوان از گیاه استویا ربادیانا به عنوان یک مکمل ضد دیابت و محافظ کلیوی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: استویا ربادیانا، دیابت، کلیه، موش سوری

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۳۰ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۳۰

مقدمه

دیابت ملیتوس، اختلال متابولیکی است که بیشترین سرعت افزایش را در جهان دارد. تقریباً ۱۰ درصد جمعیت دنیا به این بیماری مبتلا می‌باشند و بیشترین میزان آن در کشورهای در حال توسعه دیده می‌شود.

[۱، ۲]. این بیماری با افزایش قند خون (هیپرگلیسمی) مزمن ناشی از نقص در ترشح و یا کارکرد انسولین مشخص می‌گردد. این بیماری همچنین با اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی و پروتئین همراه است [۳]. هیپرگلیسمی مزمن می‌تواند به عوارض

بلند مدت و آسیب‌های بافتی مانند رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی منجر گردد [۴]. در سبب‌شناسی بسیاری از عوارض دیابت، استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر^۱ نقش مهمی ایفا می‌کند [۵]. نفروپاتی دیابتی^۲ یکی از مهمترین عوارض دیابت ملیتوس است. مطالعات اخیر نشان داده است گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر نقش کلیدی واسط در پاتوفیزیولوژی نفروپاتی دیابتی دارند [۶]. هیپر گلیسمی به عنوان تعیین کننده اصلی شروع و پیشروی نفروپاتی دیابتی نه تنها موجب تولید بیشتر گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر می‌گردد، بلکه از طریق گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت، مکانیسم‌های آنتی اکسیدانتی را تضعیف می‌نماید [۷].

طب جایگزین و سنتی نسبت به درمان‌های مرسوم دیابت و عوارض آن مزایای فراوانی دارد. تنوع، دسترسی آسان، مقبولیت و محبوبیت فزاینده در کشورهای در حال توسعه، قیمت نسبتاً پایین، عوارض جانبی نسبتاً کم از ویژگی‌های مثبت طب سنتی محسوب می‌گردند [۸]. اخیراً بویژه در کشورهای در حال توسعه گیاهان فراوانی برای مدیریت دیابت معرفی و پیشنهاد شده اند. اثرات کاهندگی قند خون (هیپو گلیسمیک) بسیاری از این گیاهان بر روی مدل‌های حیوانی و برخی نیز بر روی انسان تأیید شده است. اغلب این گیاهان حاوی گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، پلی ساکاریدها و ساپونین‌ها هستند که همگی دارای اثرات ضد دیابتی می‌باشند [۹، ۱۰]. در ایران حدود ۸۰۰۰ گونه گیاهی وجود دارد که از این تعداد ۲۳۰۰ گونه جزء گیاهان معطر و دارویی هستند و از این تعداد نیز ۴۵۰ گونه در مراکز فروش عرضه می‌شوند [۱۱].

گیاه استویا ربادیانا^۳ گیاهی از جنس استویا^۴ و خانواده کاسنیان^۵ است. این گیاه بومی کشورهای آمریکای جنوبی بوده و حاوی ترکیبات شیرین کننده مانند استویوزید، ربادیوزیدها، استویولیبوزید و دولکوزید A می‌باشد [۱۲]. طبق مطالعات گذشته ترکیبات موجود در این گیاه باعث افزایش قند خون نمی‌شوند و می‌توان از آن به عنوان یک شیرین کننده طبیعی در محصولات غذایی استفاده نمود [۱۳]. همچنین مطالعات نشان داده است گیاه استویا ربادیانا دارای اثرات مثبتی بر کاهش میزان چربی خون و فشار خون در بیماران مبتلا به هیپرلیپیدمی بوده و به دلیل داشتن عوامل آنتی اکسیدانتی می‌تواند به عنوان ضد میکروب مورد استفاده قرار گیرد [۱۴، ۱۵]. در این تحقیق، طی مراحل عصاره‌گیری قسمت شیرین گیاه استویا ربادیانا از قسمت تلخ آن جدا شده، سپس اثرات هیپو گلیسمیک و حفاظت کلیوی قسمت شیرین عصاره آبی گیاه استویا در موش‌های سوری دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار

جمع‌آوری، شناسایی و تهیه عصاره آبی گیاه

این مطالعه تجربی در تابستان سال ۱۳۹۵ انجام شد. گیاه استویا ربادیانا از محل دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی استان کرمانشاه جمع‌آوری گردید. ابتدا بخش‌های هوایی گیاه در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط سایه خشک شده، با استفاده از آسیاب مکانیکی به صورت پودر درآمد. میزان ۲۵۰ گرم از پودر گیاه با دقت توسط ترازوی دیجیتال توزین و با ۷۵۰ میلی لیتر (به نسبت وزنی/حجمی ۱ به ۳) آب مقطر به مدت دو ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. پس از ۲۴ ساعت، عصاره

¹ Reactive Oxygen Species

² Diabetic Nephropathy

³ Stevia rebaudiana

⁴ Stevia

⁵ Asteraceae

توسط کاغذ واتمن شماره ۲ صاف شد. در ادامه، برای استخراج قسمت شیرین گیاه ابتدا آن را با نرمال هگزان رسوب دهی و سپس عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلأ (روتاری با پمپ خلأ) گردید و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد و مدت زمان یک ساعت، حلال تبخیر شد و عصاره تغلیظ شده به دست آمد. به منظور خشک کردن عصاره گیاه، عصاره بدست آمده ۲۴ ساعت در دستگاه دسیکاتور قرار داده شد.

حیوانات و القای دیابت

در این تحقیق از ۳۵ رأس موش سوری نر نژاد Balb/c با میانگین وزنی 36 ± 3 گرم و با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه رازی استفاده شد. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته، دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد بدون آلودگی صوتی بود. حیوانات در تمام طول آزمایش به مقدار کافی به آب و غذای مخصوص موش دسترسی داشتند. القای دیابت با تزریق داخل صفاقی ۶۰ میلی گرم در هر کیلوگرم استرپتوزوتوسین انجام شد (۱۲). پس از سه روز قند خون حیوانات اندازه گیری شد و موش‌هایی که قند خون بالاتر از ۲۰۰ میلی گرم در دسی لیتر داشتند به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند.

نحوه تیمار

پس از اینکه موش‌ها به ۵ گروه تصادفی ۷ تایی تقسیم شدند، ۴ گروه از آنها دیابتی شدند:

- گروه اول: به عنوان کنترل منفی (دیابتی نشده) در طی ۱۵ روز ۲۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به صورت گاواژ روزانه دریافت کردند.
- گروه دوم: به عنوان کنترل مثبت (دیابتی شده) در طی ۱۵ روز، ۲۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به صورت گاواژ روزانه دریافت کردند.
- گروه سوم: به عنوان گروه تیمار شده با گلی بنکلامید در طی ۱۵ روز، گلی بنکلامید با دوز ۰/۵ میلی گرم در هر کیلو گرم به صورت گاواژ روزانه دریافت کردند.

- گروه‌های چهارم و پنجم: در طی ۱۵ روز به ترتیب با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در هر کیلو گرم عصاره آبی استویا ربادیانا به صورت گاواژ روزانه تیمار شدند. در پانزدهمین روز پس از القاء دیابت، خونگیری از قلب موش‌ها انجام و سطح قندخون توسط نوارهای گلوکومتر اندازه گیری شد.

مطالعه استرولوژیکی بافت کلیه

حیوانات توسط پنبه آغشته به کلروفرم بیهوش شدند. پس از تشریح، کلیه از بدن خارج شده و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و حجم اولیه^۱ با روش غوطه ورسازی تعیین گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ روز در ظروف مخصوص نمونه‌برداری حاوی مایع ثبوت فرمالین بافر ۱۰٪ نگهداری شدند.

نمونه‌ها به روش Orientator برش داده شدند. در این روش، کلیه بر روی دایره ای که هر نیمه آن به ۱۰ قسمت برابر تقسیم شده بود قرار داده شد. سپس یک عدد تصادفی بین ۰ تا ۱۰ انتخاب و اندام در جهت عدد انتخاب شده به دو نیمه برش داده شد. سطوح برش نیمه اول و دوم به ترتیب موازی و عمود بر محور ۰-۱۰ دایره دیگری که هر نیمه آن به ۱۰ قسمت نابرابر تقسیم شده بود قرار داده شد و با انتخاب یک عدد تصادفی بین ۰ تا ۱۰ در جهت عدد انتخاب شده برش داده شد. سپس تمام بافت در جهت برش دوم به مقاطع نیم میلی متری برش داده شد. با استفاده از یک تروکار، از یکی از مقاطع تهیه‌شده نمونه دایره ای شکلی برداشته شد و با اندازه گیری قطر آن، مساحت دایره محاسبه گردید. تمام مقاطع بدست آمده و نمونه دایره ای شکل پس از پاساژ معمول بافتی در کنار هم در یک بلوک قالب گیری و مقاطع ۵ میکرونی از آن به روش پریودیک اسید شیف^۲ (PAS) رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی، مساحت نمونه دایره ای شکل مجدداً

¹ Primary volume

² Periodic Acid Schiff

یک مربع به اضلاع ۱۰ سانتی متر بر روی یک صفحه ترانس پرنت چاپ و بر روی مانیتور نصب گردید. هر کدام از ساختارهای مورد نظر که در پروب قرار داشته و یا همچنین با اضلاع بالا و راست آن برخورد دارند مورد شمارش قرار گرفتند. در مجموع ۱۰۰ ساختار در هر کلیه مورد بررسی و طول نسبی ساختارها با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$L_v = 2 \times \frac{\sum Q}{a(\text{frame}) \times \sum \text{frames}}$$

که در آن $\sum Q$ مجموع ساختارهای شمارش شده، $a(\text{frame})$ مساحت مربع شمارش و $\sum \text{frames}$ تعداد کل مربعهای شمارش شده بود برای تعیین طول کل ساختارهای مورد نظر، طول نسبی آنها در حجم مرجع ضرب شد.

محاسبه تعداد گلومرولهای کلیوی

به منظور تعیین تعداد گلومرولها از روش دیسکتور فیزیکی^۳ استفاده شد. طبق این روش از هر بلوک بافتی، یک جفت مقطع پنج میکرونی به فاصله ۲۰ میکرون (مقاطع اول و پنجم) انتخاب و بر روی دو لام مجزا قرار داده شد. برش اول به عنوان برش مرجع^۴ و برش دوم به عنوان برش شاهد^۵ در نظر گرفته شد. برای ساخت چارچوب دیسکتور دو مربع به اضلاع ده سانتی متر بر روی دو صفحه ترانس پرنت چاپ شده و اضلاع پائین و چپ آن به عنوان خطوط ممنوعه مشخص شد. تصاویر هر دو لام با استفاده از دو میکروسکوپ و دو ویدئو پروژکتور بر روی رده انداخته شدند. سپس چهارچوب دیسکتور بر روی میدان دیدی که بطور تصادفی در برش مرجع انتخاب شده بود منطبق شده و معادل همان ناحیه انتخاب شده در برش شاهد نیز مشخص گردید. گلومرولهایی که در برش مرجع، داخل چهارچوب دیسکتور افتاده بودند و یا با اضلاع بالا و راست آن برخورد داشتند و با خطوط پائین و چپ فریم

محاسبه و میزان چروکیدگی طبق فرمول زیر به دست آمد [۱۶]:

$$\text{Volume shrinkage} := 1 - \left(\frac{AA}{AB}\right)^{1.5}$$

که در آن AA و AB به ترتیب مساحت نمونه دایره‌ای شکل بعد و قبل از پاساژ و رنگ آمیزی است. حجم نهایی یا حجم مرجع^۱ نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$V_{\text{final}} := V_{\text{primary}} \times (1 - \text{volume shrinkage})$$

برای محاسبه حجم ساختارهای مورد نظر از هر نمونه یک مقطع انتخاب و ۱۰ تا ۱۴ میدان دید بطور تصادفی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند.

محاسبه حجم نسبی و حجم کل (کورتکس، مدولا، لگنچه، لوله‌های کلیوی، گلومرول، عروق خونی)

به منظور محاسبه حجم نسبی ساختارهای مورد نظر از گرید (پروب) نقطه استفاده شد. برای تهیه گرید نقطه، در یک صفحه ترانس پرنت ۲۵ علامت + با فواصل طولی و عرضی ثابت (۵×۵) چاپ و گرید بر روی مانیتور نصب گردید. در بررسی میدانهای دید، نقاط برخورد کرده با ساختارهای مورد نظر که در پروب قرار داشتند مورد شمارش قرار گرفتند. حجم نسبی ساختارها با فرمول زیر محاسبه شد:

$$V_v := \frac{P_{\text{structure}}}{P_{\text{reference}}}$$

که در آن $\sum P_{\text{reference}}$ و $\sum P_{\text{structure}}$ به ترتیب مجموع نقاط برخورد کرده با ساختار مورد نظر و مجموع نقاط پروب در Π میدان دید است. برای تعیین حجم تام ساختارها، حجم نسبی در حجم مرجع ضرب شد.

محاسبه طول نسبی و طول کل لوله‌های کلیوی و

عروق خونی

برای محاسبه طول لوله‌های کلیوی و عروق خونی از پروب چهارچوب شمارش^۲ استفاده شد. بدین منظور

³ Physical Disector

⁴ Reference Section

⁵ Look Up Section

¹ Reference Volume

² Counting Frame

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن تست دانکن در نرم افزار SPSS-22 استفاده گردید. $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقادیر قند خون در روز پانزدهم آزمایش در گروه‌های تیمار شده با گلی بنکلامید و دوزهای مختلف عصاره آبی استویا ربادیانا نسبت به گروه دیابتی تیمار نشده کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0.05$). بطوری‌که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با عصاره استویا ربادیانا و گلی بنکلامید مشاهده نشد (جدول ۱).

دیسکتور (خطوط ممنوعه) برخورد نداشتند و از طرف دیگر در برش شاهد دیده نشدند، مورد شمارش قرار گرفتند. برای هر کلیه بین ۱۰۰ تا ۱۲۰ گلومرول شمارش شد. برای برآورد دانسیته عددی گلومرول از فرمول زیر استفاده گردید:

$$N_V = \frac{\sum Q^-}{a(\text{frame}) \times h \times \sum P^-}$$

که در آن $\sum Q$ مجموع گلومرول‌های شمارش شده در تمام چهارچوب‌های مورد شمارش، h ارتفاع دیسکتور (فاصله دو برش)، a (frame) مساحت چهارچوب دیسکتور و $\sum \text{frames}$ مجموع تعداد چهارچوب‌های مورد بررسی است. برای تعیین تعداد کل ساختارهای مورد نظر، دانسیته عددی در حجم مرجع (کورتکس کلیه) ضرب شد.

جدول ۱. مقادیر قند خون (میلی گرم در دسی لیتر) در گروه‌های کنترل منفی و مثبت و گروه‌های تیمار که با گلی بنکلامید و دوزهای مختلف عصاره آبی استویا ربادیانا درمان شده‌اند. مقادیر بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند.

قند خون (میلی گرم در دسی لیتر)		
گروه‌ها	روز اول	روز پانزدهم
کنترل منفی	۹۷/۲ $\pm$ ۳/۳ ^c	۶۲/۶ $\pm$ ۳/۷ ^c
کنترل مثبت	۲۳۳/۸ $\pm$ ۱۳/۳ ^a	۲۳۶/۲ $\pm$ ۸/۸ ^a
گلی بنکلامید	۲۱۰/۲ $\pm$ ۴۰/۱ ^a	۱۳۰/۲ $\pm$ ۷/۸ ^b
S _{۲۰۰}	۲۳۳/۸ $\pm$ ۸ ^a	۱۳۶/۲ $\pm$ ۱۳/۵ ^b
S _{۴۰۰}	۲۴۲/۸ $\pm$ ۱۳/۴ ^a	۱۳۲/۸ $\pm$ ۶/۵ ^b

کنترل منفی: دریافت کننده نرمال سالیان، کنترل مثبت: دیابتی درمان نشده، S_{۲۰۰}: دریافت کننده ۲۰۰ میکرو گرم در هر کیلوگرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا، S_{۴۰۰}: دریافت ۴۰۰ میکرو گرم در هر کیلوگرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا. حروف غیر یکسان بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد ($p < 0.05$).

معنادار وجود نداشت (جدول ۲). حجم لوله‌های پروکسیمال، دیستال، جمع کننده و عروق کلیوی در گروه دریافت کننده دوز بالای عصاره استویا ربادیانا کاهش معناداری را در مقایسه با گروه‌های دیابتی تیمار نشده، و گروه‌های دریافت کننده گلی بنکلامید و دوز پایین عصاره استویا ربادیانا نشان داد ($p < 0.05$) (جدول ۳).

نتایج مطالعه استریولوژیک نشان داد که وزن کلیه، حجم کلیه، کورتکس و مدولا در گروه دریافت کننده دوز بالای عصاره استویا ربادیانا نسبت به گروه‌های دیابتی تیمار نشده، و گروه‌های دریافت کننده گلی بنکلامید و دوز پایین عصاره استویا ربادیانا کاهش معنی‌داری داشت اما بین گروه‌های دریافت کننده دوز بالای عصاره استویا ربادیانا و کنترل منفی ارتباط

جدول ۲. وزن (میلی گرم) کلیه و حجم (میلی متر مکعب) کلیه، کورتکس و مدولا در گروه های کنترل منفی و مثبت و گروه های تیمار که با گلی بنکلامید و دوز های مختلف عصاره آبی استویا ربادیانا درمان شده اند. مقادیر بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده اند.

گروه ها	کلیه	کلیه	حجم (میلی متر مکعب)	کورتکس	مدولا
کنترل منفی	$135/2 \pm 1/4^c$	$110/5 \pm 2/9^c$	$77/77 \pm 4/3^c$	$25/3 \pm 3/2^c$	
کنترل مثبت	$192/7 \pm 15/6^a$	$171 \pm 14/7^a$	$135 \pm 11/8^a$	$34/9 \pm 3/7^a$	
گلی بنکلامید	$160/5 \pm 10/9^b$	$143/2 \pm 10/2^b$	$114/8 \pm 10/3^b$	$30/2 \pm 5/1^b$	
$S_{p..}$	$162/8 \pm 27/7^b$	$142/5 \pm 22/3^b$	$104/2 \pm 19/4^b$	$38/9 \pm 7^a$	
$S_{E..}$	$120 \pm 21/3^c$	$95/8 \pm 12/2^c$	$71/6 \pm 9/8^c$	$24/2 \pm 3/8^c$	

کنترل منفی: دریافت کننده نرمال سالین، کنترل مثبت: دیابتی درمان نشده، $S_{p..}$: دریافت کننده ۲۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا، $S_{E..}$: دریافت ۴۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا. حروف غیر یکسان بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها می باشد ($p < 0.05$).

جدول ۳. مقادیر حجم (میلی متر مکعب) لوله های پروکسیمال، دیستال، مجاری جمع کننده ادراری، قوس هنله، بافت بینابینی و عروق در گروه های کنترل منفی و مثبت و گروه های تیمار که با گلی بنکلامید و دوز های مختلف عصاره آبی استویا ربادیانا درمان شده اند. مقادیر بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده اند.

گروه ها	لوله پروکسیمال	لوله دیستال	مجاری جمع کننده	قوس هنله	بافت بینابینی	عروق
کنترل منفی	$68/5 \pm 4^c$	$16/5 \pm 3^b$	$2/9 \pm 4^{ab}$	$1/3 \pm 0/38^b$	$11/4 \pm 2^b$	$9/1 \pm 1/2^b$
کنترل مثبت	$111 \pm 9/9^a$	$26/7 \pm 8/1^a$	$25/4 \pm 6^a$	$1/76 \pm 0/38^a$	$17/3 \pm 3^a$	$15/9 \pm 2/8^a$
گلی بنکلامید	$87/4 \pm 11^b$	$21/5 \pm 4/8^a$	$23/8 \pm 5/7^a$	$1/2 \pm 0/21^b$	$13/4 \pm 3^{ab}$	$11/6 \pm 1/6^b$
$S_{p..}$	$68/6 \pm 20/9^c$	$23/3 \pm 8/9^a$	$23 \pm 5/5^b$	$1/25 \pm 0/37^b$	$14/6 \pm 4/1^{ab}$	$9/6 \pm 4/9^b$
$S_{E..}$	$49/1 \pm 8/1^d$	$15/9 \pm 3/7^b$	$16/1 \pm 4/3^b$	$1 \pm 0/24^b$	$10/7 \pm 2/7^b$	$6/2 \pm 1/4^c$

کنترل منفی: دریافت کننده نرمال سالین، کنترل مثبت: دیابتی درمان نشده، $S_{p..}$: دریافت کننده ۲۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا، $S_{E..}$: دریافت ۴۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا. حروف غیر یکسان بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها می باشد ($p < 0.05$).

مطالعات استریولوژیکی طول پارامترهای کلیه نشان داد که طول لوله های پروکسیمال، دیستال و مجاری جمع کننده در گروه های دریافت کننده دوز پایین و بالای عصاره استویا ربادیانا کاهش معناداری در مقایسه با گروه های دیابتی درمان نشده و دریافت کننده گلی بنکلامید داشت ($p < 0.05$). طول قوس هنله و عروق کلیوی در گروه دوز بالای عصاره استویا ربادیانا نسبت به گروه های دیابتی تیمار نشده و دریافت کننده گلی بنکلامید کاهش معناداری داشت ($p < 0.05$) (جدول ۴).

جدول ۴. تعداد و حجم گلوامرول ها (میلی متر مکعب) در گروه های کنترل منفی و مثبت و گروه های تیمار که با گلی بنکلامید و دوز های مختلف عصاره آبی استویا ربادیانا درمان شده اند. مقادیر بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده اند.

گروه ها	حجم گلوامرول (میلی متر مکعب)	تعداد گلوامرول
کنترل منفی	$0/002 \pm 0/0001^a$	$27790/6 \pm 1335^c$
کنترل مثبت	$0/003 \pm 0/0003^c$	22534 ± 574^a
گلی بنکلامید	$0/0025 \pm 0/0003^b$	25011 ± 1214^b
$S_{p..}$	$0/0029 \pm 0/0006^{bc}$	23902 ± 4010^a
$S_{E..}$	$0/0025 \pm 0/0003^{ab}$	26183 ± 4906^b

کنترل منفی: دریافت کننده نرمال سالین، کنترل مثبت: دیابتی درمان نشده، $S_{p..}$: دریافت کننده ۲۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا، $S_{E..}$: دریافت ۴۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا. حروف غیر یکسان بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین گروه ها می باشد ($p < 0.05$).

حجم گلوامرول‌ها در گروه تیمار شده با دوز بالای عصاره استویا ربادیانا اختلاف معنی‌داری با گروه دیابتی درمان نشده و گروه دریافت کننده دوز پائین داشت ($p < 0.05$). اختلاف تعداد گلوامرول‌ها در بین گروه

دریافت کننده دوز بالا و گروه کنترل منفی معنی‌دار نبود، در حالی که این اختلاف در بین سایر گروه‌ها و گروه کنترل منفی معنی‌دار بود ($p < 0.05$) (جدول ۵).

جدول ۵. طول (متر) لوله‌های پروکسیمال و دیستال، مجاری جمع کننده ادراری، قوس هنله، عروق کلیوی در گروه‌های کنترل منفی و مثبت تیمار که با گلی بنکلامید و دوزهای مختلف عصاره آبی استویا ربادیانا درمان شده‌اند. مقادیر بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند.

طول (متر)					
گروه‌ها	لوله پروکسیمال	لوله دیستال	مجاری جمع کننده	قوس هنله	عروق
کنترل منفی	$23/8 \pm 5/7^c$	$23 \pm 3/3^b$	$42/3 \pm 5/7^b$	$19/5 \pm 4/4^b$	$56/6 \pm 11/7^b$
کنترل مثبت	$56/8 \pm 7/3^a$	$42 \pm 6/8^a$	$52/1 \pm 8/9^a$	$28/3 \pm 6/3^a$	$73/5 \pm 6/8^a$
گلی بنکلامید	$46/4 \pm 8/3^b$	$37/4 \pm 9/8^a$	$54/8 \pm 9/7^a$	$27/1 \pm 5/6^a$	$65/6 \pm 11^a$
$S_{2..}$	$35/1 \pm 8^c$	$29/4 \pm 7/6^b$	$44 \pm 6/9^b$	$23/8 \pm 7/9^a$	$61/5 \pm 11/2^{ab}$
$S_{4..}$	$27/3 \pm 4/1^c$	$25/8 \pm 7/8^b$	$31/8 \pm 8/1^c$	$19/4 \pm 3/8^b$	$50/8 \pm 8/1^b$

کنترل منفی: دریافت کننده نرمال سالین، کنترل مثبت: دیابتی درمان نشده. $S_{2..}$: دریافت کننده ۲۰۰ میکرو گرم در هر کیلوگرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا. $S_{4..}$: دریافت ۴۰۰ میکرو گرم در هر کیلوگرم عصاره آبی بخش شیرین استویا ربادیانا. حروف غیر یکسان بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌ها می باشد ($p < 0.05$).

بحث

یکی از اصلی ترین وظایف کلیه بیرون راندن مواد زاید و سموم تولیدشده بر اثر متابولیسم و یا خورده شده، می باشد. علاوه بر این، کلیه به واسطه نقشی که در سم زدایی مواد سمی با منشأ داخلی و خارجی دارد، به طور مداوم در معرض انواع مختلف سموم داخلی و خارجی با غلظت بالا قرار دارد [۱۷]. سمومی که با فیزیولوژی کلیه تداخل دارند در دوزهای بالا، اختلالاتی را در فرآیندهای آن ایجاد خواهند کرد، هرچند، کلیه ظرفیت بالایی برای بازسازی و ذخیره سازی دارد. استرپتوزوتوسین، ماده ای سمی است که سبب دیابت نوع ۱ می شود. سایر عوارض این ماده شامل تهوع شدید، اسهال، استفراغ، آنمی، لکوپنی، ترومبوسیتوپنی، پروتئینوری، آزوتمی می باشد. اثرات دیابت زایی این ماده به دلیل جذب آن توسط سلول‌های جزایر بتا پانکراس، سلول‌های کبدی و سلول‌های کلیوی و اثرات سمی آن بر روی این سلول‌ها می باشد [۱۸]. در طی مطالعات مختلفی مشخص شده است که استرپتوزوتوسین به دلیل

تولید رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن پراکسیداسیون لیپیدها در غشای سلول‌های کلیوی، سبب اثرات زیان باری بر کلیه می شود. در مطالعه ای نشان داده شد که پس از استفاده از استرپتوزوتوسین، تظاهرات پروتئینوری، گلوامرولواسکلروزیس، کانون‌های نکروز، خونریزی و تغییر هیالین جدار عروق آوران و وایران، وارد شدن ندول‌های ائوزینوفیلیک کوچک از کپسول بومن به فضای ادراری و چسبندگی کپسولار بروز می کند [۱۹]. بنابراین استفاده از آنتی اکسیدانت‌های خوراکی نظیر عصاره آبی گیاهان که برای درمان بیماری‌های مختلفی همواره مطرح بوده اند [۲۲-۲۰]، می توانند به عنوان عوامل درمانی در آسیب‌های کلیوی ناشی از دیابت موثر واقع شوند. گیاه استویا ربادیانا از گیاهانی است که در طب سنتی برای درمان بسیار از بیماری‌ها از قبیل کنترل قند خون مورد استفاده قرار می گیرد.

نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان می دهد که استفاده از بخش شیرین عصاره گیاه استویا ربادیانا، افزایش قند ناشی از مسمومیت با استرپتوزوتوسین را

کاهش می‌دهد. در مطالعه ای نشان داده شد که عصاره نیمه قطبی گیاه استویا در دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در هر کیلو گرم سبب کاهش معنادار قند خون در مقایسه با گروه دریافت کننده گلی بنکلامید می‌شود [۲۳]. همچنین در مطالعه دیگر گزارش شده است که استفاده از دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره الکلی گیاه استویا ربادیانا (قسمت تلخ) سبب کاهش معنادار قند خون در مقایسه با گروه کنترل دیابتی می‌گردد [۱۲]. بنابراین، نتایج این مطالعه با نتایجی که در گذشته با استفاده از گیاه استویا بدست آمده است، کاملاً مطابقت دارد.

مطالعات استروئولوژیکی نشان می‌دهد که وزن، حجم کلیه، تعداد و حجم گلو مرون‌ها، حجم و طول لوله‌های پروکسیمال و دیستال، مجاری جمع کننده، قوس هنله، بافت بینابینی و عروق کلیوی در گروه دریافت کننده دوز بالای عصاره استویا ربادیانا نسبت به سایر گروه‌های دیابتی کاهش بیشتری یافته است. این یافته نیز نشان دهنده قدرت بالای آنتی اکسیدانی این گیاه در دوز بالا است که مانع از افزایش حجم و طول ساختارهای مذکور شده است. افزایش تولید رادیکال‌های آزاد توسط استرپتوزوتوسین احتمالاً باعث نقص عملکرد میتوکندری‌ها در موش‌های دیابتی می‌شود [۱۸]. افزایش چشمگیر تعداد میتوکندری‌ها و کاهش واضح در گرانول‌های گلیکوژن با هیپرتروفی لوله‌های کلیوی و دیگر ساختارهای کلیه مشخص می‌شود که این تغییر در موش‌های دیابتی تیمار نشده به وضوح وجود داشت اما در موش‌های دریافت کننده عصاره استویا ربادیانا چنین اختلالاتی دیده نشد. در مطالعه حق نظری و همکاران نشان داده شد که دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرو گرم در هر کیلو گرم عصاره الکلی گیاه استویا ربادیانا (قسمت تلخ) نیز وزن کلیه،

حجم کلیه (حجم کورتکس، گلو مرون، لوله‌های پروکسیمال و دیستال، قوس هنله، بافت‌های بینابینی و عروق کلیوی) و طول ساختارهای کلیه (لوله‌های پروکسیمال و دیستال، مجاری جمع کننده، قوس هنله و عروق کلیوی) را به صورت معناداری کاهش می‌دهد [۱۲].

در این مطالعه به دلیل محدودیت‌های موجود امکان بررسی اثرات مصرف طولانی مدت این عصاره بر روی عوارض کلیوی ناشی از دیابت مورد بررسی قرار نگرفت که می‌تواند در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد. علاوه بر این، بررسی تغییرات بافت کلیوی پس از القاء دیابت و درمان با عصاره مذکور در سطح میکروسکوپ الکترونی برای مطالعات تکمیلی آینده پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه گیری

نتایج حاضر نشان داد عصاره آبی بخش شیرین گیاه استویا ربادیانا به ویژه در دوز بالا، می‌تواند قند خون را کاهش داده و باعث بهبود ساختار کلیه شده و از تخریب و افزایش حجم (هیپرتروفی) ساختارهای کلیوی در بیماری دیابت پیشگیری به عمل آورد. لذا شناسایی مولکول‌های فعال سازنده ی این گیاه و کارآزمایی بالینی این مولکول‌ها، می‌تواند در جهت تهیه و فرمولاسیون داروی جدید ضد دیابت و محافظ کلیوی با منشا گیاهی سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه رازی و دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی کرمانشاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

- 1-Vetrichelvan T, Jegadeesan M, Devi BAV. Anti-diabetic Activity of Alcoholic Extract of Celosia argentea LINN. Seeds in Rats. Biol Pharm Bull. 2002 Apr; 25(4):526-528.
- 2-Park K. Park's textbook of preventive and social medicine, 15nd ed. Jabalpur: Banarsidas Bhanot, 1997: 255-265.

- 3-Joseph B, Jini D. Insight into the hypoglycemic effects of traditional Indian herbs used in the treatment of diabetes. *Res J Med Plants*. 2010 Nov; 5(4):352–376.
- 4-International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas, 3rd ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2006. Available from: URL: <http://www.diabetesatlas.org>.
- 5-Yue KK, Chung WS, Leung AW, Cheng CH. Redox changes precede the occurrence of oxidative stress in eyes and aorta, but not in kidneys of diabetic rats. *Life Sci*. 2003 Oct; 73(20): 2557–2570.
- 6-Ha H, Kim KH. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*. 1995 Sep; 51:S18–21.
- 7-Oršolić N, Bašić I. Honey Bee Products and their polyphenolic compounds in treatment of Diabetes, *Recent Progress Med Plants*; USA: Studium Press LLC, 2008: 455–471.
- 8-Ahmed D, Sharma M, Mukerjee A, Ramteke PW, Kumar V. Improved glycemic control, pancreas protective and hepatoprotective effect by traditional poly-herbal formulation “Qurs Tabasheer” in streptozotocin induced diabetic rats. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Jan; 13(1):10.
- 9-Jung M, Park M, Lee CH, Kang YH, Kang ES, Kim SK. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem*. 2006 Nov; 13(10):1203–1218.
- 10-Fahey J W, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 2001Jan; 56(1):5–51.
- 11-Zangeneh A, Zangeneh MM, Hajialiani M, Moradi R, Nazari F, Sanjabi Shirazi F, et al. Peruse a Plant product as an antimicrobial agent. *IJCMPR*. 2017 Feb; 3(2): 1348-1351.
- 12-Hagh-Nazari L, Goodarzi N, Zangeneh MM, Zangeneh A, Tahvilian R, Moradi R. Stereological study of kidney in streptozotocin-induced diabetic mice treated with ethanolic extract of *Stevia rebaudiana* (bitter fraction). *Comp Clin Path*. 2017 Mar; 26(2):455–463.
- 13-Zangeneh MM, Najafi F, Moradi R, Tahvilian R, Haghazari L, Zangeneh A. Evaluation of the in vitro antibacterial activities of alcoholic extract of *Stevia rebaudiana* against *Escherichia coli* O157: H7 (ATCC No. 25922). *AJPAMC*. 2016 Jul; 4(3):131- 136.
- 14-Zangeneh MM, Najafi F, Tahvilian R, Salmani S, Haghazari L, Zangeneh A, et al. Ethnomedicinal Plants: In vitro antibacterial effects of ethanolic extract of *Stevia rebaudiana*. *Int J Ayu Pharm Chem*. 2017 Jan; 6(1): 251-259.
- 15-Zangeneh MM, Poyanmehr M, Najafi F, Zangeneh A, Moradi R, Tahvilian R, et al. In vitro antibacterial activities of ethanolic extract of *Stevia rebaudiana* against *Bacillus subtilis* (ATCC No. 21332). *IJRPNS*. 2016 Nov; 5(6): 320-325.
- 16-Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc*. 2003 Dec; 75(4): 469–86.
- 17-Schrier RW, Berl T, Harbottle JA. Mechanism of the Antidiuretic Effect Associated with Interruption of Parasympathetic Pathways. *J Clin Invest*. 1972 Oct; 51(10): 2613–20.
- 18-Laguens RP, Candela S, Hernández RE, Gagliardino JJ. Streptozotocin-induced liver damage in mice. *Horm Metab Res*. 1980 May; 12(5): 197-201.
- 19-Ashrafi helan J, Yazdanparast R, Esmaili MA, Nowrozi M. A pathologic study on changes of pancreas, liver and kidney due to *Teucrium polium* extract in streptozotocin induced-diabetic rats. *Pharm Sci*. 2010 Mar; 16(1):11-20.
- 20-Najafi F, Zangeneh MM, Tahvilian R, Zangeneh A, Amiri H, Amiri N, et al. In vitro antibacterial efficacy of essential oil of *Allium sativum* against *Staphylococcus aureus*. *IJPPR*. 2016 May; 8(12): 2039-2043.
- 21-Zangeneh MM, Tahvilian R, Zangeneh A, Moradi R, Najafi F, Haghazari L. Effect of *Alhagi maurorum* oil on anxiety markers in Balb/C male mice. *OJVR*. 2017 Mar; 21(3): 115-117.
- 22-Foroughi A, Pournaghi P, Najafi F, Zangeneh A, Zangeneh MM, Moradi R. Medicinal Plants: Antibacterial effects and chemical composition of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *IJCPR*. 2017 Jan; 8(1): 13-17.
- 23-Misra H, Soni M, Silawat N, Mehta D, Mehta BK, Jain DC. Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011 April; 3(2): 242-248.