



دانشگاه صنعتی اربیل  
دانشکده علوم  
گروه آموزشی زیست‌شناسی

پایان‌نامه برای دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد  
در رشته‌ی زیست‌شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

**بررسی اثرات نانوذرات نقره تهیه شده با  
*Galega officinalis* بر هماتولوژی و غلظت سرمی آنزیم-  
های کبدی در دیابت القا‌یی با آلوکسان در مدل موش‌های  
صحرائی**

پژوهشگر:

فریبا عظیمی کوده کهریز

استاد راهنما:

دکتر فریبا محمودی

استاد مشاور:

دکتر فرزانه محمودی

شهریور ۱۳۹۸

عنوان و نام پدیدآور:	بررسی اثرات نانوذرات نقره تهیه شده با <i>Galega officinalis</i> بر هماتولوژی و غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی در دیابت القا‌یی با آلوکسان در مدل موش‌های صحرایی / فریبا عظیمی کوده کهریز
استادان راهنما:	دکتر فریبا محمودی
استادان مشاور:	دکتر فرزانه محمودی
تاریخ دفاع:	۱۳۹۸/۶/۱۲
تعداد صفحات:	۹۴ ص.
شماره پایان‌نامه:	نام گروه / شماره پایان‌نامه

### چکیده:

**هدف:** گیاه گالگا (*Galega officinalis*) به دلیل شباهت ترکیبی با متفورمین یکی از بهترین گیاهان دارویی در دیابت است. بیماری دیابت مزمن با اختلال عملکرد کبدی، کلیوی، تغییرات پارامترهای هماتولوژی مرتبط است. نانوذرات نقره به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدهیپرگلیسمی ترکیبات مهمی در تحقیقات زیستی محسوب می‌شوند. در تحقیق حاضر برای اولین بار اثرات نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره اندام‌های هوایی گیاه گالگا بر پارامترهای هماتولوژی و غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی در موش‌های صحرایی بررسی شد.

**روش‌شناسی پژوهش:** در تحقیق حاضر، ۳۰ موش صحرایی نر در ۶ گروه (در هر گروه  $n=5$ ) از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰g - ۱۸۰ استفاده شد. موش‌های صحرایی سالم یا مبتلا به دیابت نوع یک القا‌یی با آلوکسان مونوهیدرات (۱۵۰mg/Kg)، به ترتیب تزریق داخل صفاقی سالین یا ۲/۵ mg/Kg نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره گیاه گالگا یا روش شیمیایی را به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. یک روز بعد از آخرین تزریق داروها، در حالت ناشتا نمونه‌های خونی از موش‌های صحرایی جمع‌آوری شد. میانگین غلظت سرمی گلوکز، اوره، کراتینین، آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، اسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT)، آلکالین فسفاتاز (ALP)، با استفاده از روش اسپکتروفتومتری، درصد هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1C) و پارامترهای هماتولوژی با استفاده از دستگاه اتوآنالایز هماتولوژی تعیین شد. داده‌های حاصل با استفاده از آزمون‌های یک طرفه و با نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون تعقیبی دانکن یا توکی بررسی گردید.

**یافته‌ها:** میانگین غلظت سرمی گلوکز و اوره، در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. میانگین غلظت سرمی آنزیم‌های ALT و AST در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سبز در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. میانگین غلظت سرمی ALT در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش نیافت. میانگین غلظت سرمی ALT در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش یافت. میانگین غلظت هموگلوبین و درصد هماتوکریت در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سبز در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش نیافت. میانگین غلظت سرمی آنزیم‌های GGT (GGT)، ALP، میانگین تعداد گلبول‌های سفید و درصد HbA1C در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. میانگین غلظت سرمی آلبومین در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. کاهش میانگین غلظت سرمی کراتینین، کاهش تعداد گلبول‌های قرمز و افزایش تعداد پلاکت‌ها در گروه دیابتی دریافت‌کننده نانوذره نقره سنتز شده با عصاره گیاه گالگا در مقایسه با گروه دیابتی از نظر آماری معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** هر دو نانوذره سنتز شده به روش شیمیایی یا سبز اثرات کاهشی موثر در کاهش گلوکز خون موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت دارند ولی نانوذره نقره سنتز شده با عصاره گیاه گالگا احتمال دارد اثرات محافظتی بیشتری در تنظیم عملکرد کبد در مقایسه با نانوذره شیمیایی اعمال کند. آن ممکن است با جلوگیری از آسیب هپاتوسیت‌های کبدی سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی را کاهش دهد. همچنین آن ممکن است در درمان آسیب‌های قلبی-عروقی مرتبط با دیابت مزمن از طریق بهبود پارامترهای هماتولوژیکی موثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** گالگا، نانوذرات نقره، آنزیم‌های کبدی، پارامترهای هماتولوژی

## ۱- مقدمه و هدف

---

### ۱-۱- مقدمه

دیابت یکی از اختلالات متابولیکی است که توسط ترکیبی از فاکتورهای وراثتی و محیطی ایجاد می‌شود و با ایجاد نقص در تولید انسولین، فعالیت انسولین یا هردو، منجر به هیپرگلیسمی می‌گردد. هیپرگلیسمی مزمن به نوبه خود منجر به آسیب کلیه، چشم، کبد و غیره می‌گردد. علاوه بر اختلالات متعدد، در بیماری دیابت اندام‌های کبد، کلیه و چشم دچار آسیب می‌گردد. دیابت منجر به کارکرد غیرعادی کلیه شده و سطوح تری‌گلیسرید، کلسترول کل، اسید اوریک و کراتینین و سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی درموش‌های دیابتی افزایش می‌یابد (Manukumar et al, 2017).

دیابت نوع ۱ یک بیماری خودایمنی مزمن است که سلول‌های پانکراس، انسولین تولید نمی‌کنند و دیابت نوع دو با نقص در عملکرد سلول‌های بتا پانکراس و مقاومت به انسولین یا کاهش تولید انسولین همراه است (Manukumar et al, 2017). هر چند که رژیم غذایی مناسب، ورزش، استفاده از انسولین و داروهای ضد هیپرگلیسمی، اولین راه درمانی دیابت محسوب می‌شوند. ولی در بین این فاکتورها گیاهان دارویی سنتی از دیرباز به خاطر دارا بودن اثرات ضد دیابتی و عوارض جانبی کمتر، همواره مورد توجه فراوان بوده‌اند (Manukumar et al, 2017). آلوکسان مونوهیدرات دارویی است که در القای دیابت به ویژه نوع یک در مدل حیوانی استفاده می‌شود و باعث تخریب سلول‌های بتای پانکراس، هیپرگلیسمی و عدم ترشح انسولین مشاهده می‌گردد (Szkudelski et al, 2001).

کبد نقش مهمی در حفظ سطوح طبیعی گلوکز خون در هنگام گرسنگی و بعد از غذا خوردن ایفا می‌کند. در واقع تخریب کبدی ناشی از مقاومت به انسولین ممکن است

به توسعه دیابت نوع ۲ کمک شایانی کند. آنزیم‌های کبدی شامل آسپارات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، گاماگلوتامیل ترانسفراز (GGT) و آلکالین فسفاتاز از نظر کلینیکی برای ارزیابی عملکرد صحیح هپاتوسیت‌های کبدی و دستگاه صفراوی استفاده می‌شود (Ahn et al, 2014).

گیاه گالگا (*Galega officinalis*) گیاهی علفی از خانواده باقلائیان یا لگومینه (Fabaceae) است که به طور سنتی از زمان قدیم برای درمان دیابت استفاده می‌شود (Abtahi-Evari et al, 2017). و غنی از ترکیبات فیتوشیمیایی به ویژه گالگین (galegine) و گوانیدین می‌باشد که خاصیت ضد هیپرگلیسمی بالایی دارند. به طوری که کشف خاصیت ضد دیابتی و ترکیب موثر گیاه گالگا منجر به سنتز داروی متفورمین گردید (Bailey, 2017).

مطالعات پیشین نشان داده است که، تزریق عصاره گالگا منجر به کاهش گلوکز خون در افراد دیابتی می‌شود. در واقع مصرف گالگا با ایجاد حساسیت به انسولین و جلوگیری از آسیب‌های کبدی و کلیوی حاصل از دیابت، گیاه دارویی موثر در درمان دیابت می‌باشد (Sebeva et al, 2014; Abtahi-Evari et al, 2017; Khodadadi, 2016). مصرف گیاه گالگا نقش مهمی در کاهش وزن ایفا کرده است (Palit et al, 1999). در موش‌های مبتلا به PCOS، مصرف گیاه گالگا، سبب کاهش گلوکز خون شده است (Abtahi-Evari et al, 2018). توسعه نانوذرات فلزی سنتز شده با روش‌های سبز با استفاده از عصاره گیاهان یا شیمیایی به منظور بررسی اعمال اثرات مفید یا سمی در سیستم‌های بیولوژیکی مورد توجه قرار گرفته است (Prabhu et al., 2018; Alkaladi et al, 2014). گزارش شده است که نانوذرات سنتز شده به روش سبز با گیاهان مختلف عملکرد کلیوی را بهبود بخشیده و سطح گلوکز خون را در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش داده است. (Edress et al, 2017; BarathManikanth et al, 2010; Selim et al, 2015). نانوذرات نقره به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و کاهش گلوکز خون در بیماری دیابتی و غیره در تحقیقات اخیر حائز اهمیت فراوان هستند. سنتز سبز نانوذرات نقره با استفاده از احیای یون‌های نقره به وسیله عصاره گیاه بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. استفاده از عصاره گیاهان برای سنتز نانوذرات نقره علاوه بر

کم‌هزینه بودن فرآیند سنتز، نانوذرات با اندازه کوچکتری را در مقایسه با سنتز شیمیایی ایجاد می‌کند. همچنین ماهیت عصاره گیاه هم در کاربردهای نانوذرات در بخش‌های مختلف دارای نقش مهمی هستند ( Sandip Gangadhar et al,2017; Sista ) Kameswara et al, 2016;Ahmed et al,2016). در تحقیق حاضر برای اولین بار اثرات نانوذرات نقره تهیه شده با گالگا (*Galega officinalis*) بر پارامترهای هماتولوژی و غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی در دیابت القایی با آلوکسان مونوهیدرات در موش‌های صحرایی نر بررسی می‌شود.

## ۲- مبانی و پیشینه تحقیق

### ۲-۱- دیابت (DM<sup>۱</sup>)

دیابت یک نوع بیماری متابولیک مزمن است که توسط عدم وجود مطلق یا نسبی انسولین یا کاهش فعالیت انسولین ایجاد می شود و باعث هیپر گلیسمی و اختلالاتی در متابولیسم کربو هیدراتها، پروتئین ها و چربی ها می شود (Ravi et al, 2016). که به دلیل ترکیبی از عوامل ارثی و محیطی منجر به هیپر گلیسمی میشود. هیپر گلیسمی مزمن در طی دیابت موجب گلیکاسیون پروتئین های بدن شده و منجر به عوارض ثانویه ای در چشم ها (رتینوپاتی، کلیه ها (نفروپاتی)، اعصاب (نوروپاتی) و شریان های بدن می شود (Manu kumar et al, 2017). پانکراس و انسولین ترشح شده از آن مسئول انتقال گلوکز خون به سلول های مختلف بدن هستند و اگر انسولین به اندازه کافی تولید نشود، سلول های بدن نمی توانند از خون، گلوکز کافی جذب کند و به این ترتیب سطح قند خون افزایش می یابد که به عنوان هیپر گلیسمی نامیده می شود. سطح قند خون بالا در بدن، علائمی مانند پلوری (ادرار مکرر)، پلی دسپیا (افزایش تشنگی) و پلی فاژیا (افزایش گرسنگی) بوجود می آورد (Manu kumar et al, 2017).

### ۲-۱-۱- دیابت نوع ۱ (T1D)

دیابت وابسته به انسولین (IDDM<sup>۲</sup>) یا دیابت سیستم ایمنی موثر گفته می شود که ناشی از واکنش خودکار ایمنی بدن است که به سلولهای بتا پانکراس حمله می کند. بنابراین یک بیماری خود ایمنی است که با کمبود مطلق انسولین مشخص می شود. به نظر می رسد دیابت نوع ۱ به علت عوامل محیطی ناشناخته در افراد آسیب پذیر به ارث

1. Diabetes Melitus

2. Insulin Dependent Diabetes Melitus

می‌رسد و به علت نقص جهشی در ژن (HLA) موجود در لوکوس کروموزوم 6P21 بوجود می‌آید (Manu kumar et al, 2017). سیتوکین TNF- $\alpha$  در بیماری خود ایمنی ایجاد می‌شود که موجب آسیب سلول‌های بتا می‌شود و سپس هیپرگلیسمی به وجود می‌آید و این عوامل موجب کاهش سیگنالینگ انسولین می‌شود. مقاومت به انسولین مربوط به چاقی، نقش مهمی در آترواسکلروز در ضایعات عروقی دارد که به علت وجود TNF- $\alpha$  است. TNF- $\alpha$  نقش مهمی در بیماران دیابتی نوع ۱ ایفا می‌کند (Edrees et al, 2017). خطرات زیادی برای مبتلایان به دیابت نوع ۱ از جمله آسیب به رگ‌های کوچک در چشم‌ها (رتینوپاتی)، در اعصاب (نوروپاتی)، در کلیه‌ها (نفروپاتی) و افزایش خطر ابتلا به بیماری قلبی و سکتة مغزی وجود دارد.

## ۲-۱-۲- دیابت نوع ۲ (T2D)

به عنوان دیابت غیروابسته به انسولین (NIDDM) یا دیابت بزرگسالی نامیده میشود. نود درصد موارد دیابت را شامل می‌شود و معمولاً بعد از ۴۰ سالگی اتفاق می‌افتد که با مقاومت به انسولین و یا اختلال در عملکرد سلول‌های بتا و کاهش تولید انسولین همراه است. با پیشرفت بیماری ممکن است عدم تولید انسولین نیز ایجاد شود و نیز به دلیل مقاومت به انسولین در بافت چربی، عضلات و کبد باعث اختلالات ترشح انسولین از سلولهای پانکراس می‌شود (kartich et al, 2014). تعامل انسولین با گیرنده ویژه انسولین (INSR) در سطح سلول هدف مهم است. پاتو فیزیولوژی عمل انسولین در بدن وابسته به فعال سازی INSR و فعال سازی انتقال سیگنال خاص به دنبال آن است که نتیجه آن فعال شدن تیروزین کیناز می‌باشد. سپس با تولید سیگنال‌های داخلی، فعالیت آنزیم تنظیم شده و در نهایت سلول‌ها قادر به گرفتن و استفاده از گلوکز می‌باشند. اگر نقص در ژن INSR وجود داشته باشد، باعث ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود و احتمال پیشرفت T2D وجود دارد. اختلال عملکرد سلول‌های بتا ممکن است به شرایط پاتوبیولوژیکی در T2D منجر شود. در واقع تخریب کبدی ناشی از مقاومت به انسولین ممکن است به توسعه دیابت نوع ۲ کمک کند. هیپرانسولینمی مزمن و مقاومت به انسولین، باعث ایجاد آبشاری از واکنش‌هایی می‌شود که افزایش لیپوژنز و تغییرات چربی را در پی دارد. تجمع اسیدهای چرب آزاد باعث سمیت هیپاتوسیت‌ها و اختلال در غشای سلولی می‌شود و نیز اختلال عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو و افزایش التهاب مجاری ادراری بوجود می‌آید (Ghimire et al , 2018).

### ۳-۱-۲- دیابت بارداری (GDM<sup>۳</sup>)

در دوران بارداری بدون سابقه قلبی رخ می دهد و باعث افزایش سطح قند خون می شود. قبل و بعد از تولد ایجاد می شود، اما بعد از چند ماه از بارداری از بین خواهد رفت. فرزندان نیز در معرض خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ در طول زندگی هستند. تنها، رژیم غذایی برای درمان GDM استفاده می شود (Manu kumar et al, 2017).

### ۴-۱-۲- دیابت ثانویه (SD)

به علت نقص در عملکرد سلول های بتا اتفاق می افتد اما در آن سطح گلوکز توسط کاهش سطح آهن کنترل می شود. ممکن است به علت مصرف داروها و یا وجود برخی بیماری ها باشد از جمله جراحی و یا سرطان لوزالمعده و یا بیماری هایی که سبب افزایش آنتاگونیست های انسولین می شود. مانند بیماری کوشینگ که در آن ترشح هورمون ها از غدد آدرنال افزایش می یابد و به علت ایجاد مقاومت به انسولین در بدن، قند خون بالا می رود. در بیماری هموکروماتوزیس، به علت جذب آهن از دستگاه گوارش، رسوب آن در قسمت های مختلف بدن اتفاق می افتد که می تواند باعث آسیب کبد شود و در اثر رسوب در پانکراس، دیابت ایجاد می کند.

### ۵-۱-۲- عوارض دیابت

امروزه درمان های در دسترس برای دیابت شامل انسولین و یا داروهای خوراکی از جمله سولفونیل اوره و مهارکننده های آلفا گلوکوزیداز است که دارای عوارض جدی هستند. هدف اصلی درمان دیابت، پیشگیری از عوارض ماکروواسکولار ( انفارکتوس میوکارد، نارسایی قلبی و سکته مغزی) و عوارض میکروواسکولار (رتینوپاتی، نوروپاتی و نفروپاتی) است. دیس لیپیدمی (اختلال در سطوح طبیعی چربی ها، کلسترول و تری گلیسرید) یک عامل عمده خطر قلبی - عروقی در دیابت است. بنابراین تشخیص دیس لیپیدمی و درمان آن برای کاهش خطر قلبی - عروقی در دیابت مورد نیاز است (Cisneros et al , 2011).

---

3. Gestational Diabetes Mellitus



#### ۱-۵-۱-۲- هموگلوبین گلیکوزیله

مطالعات نشان داده که گلیکوزیله شدن پروتئین‌های مختلف، باعث ایجاد عوارض مزمن در دیابت می‌شود. HbA<sub>1c</sub> مولکولی است که در گلبولهای قرمز دیده می‌شود و به اتصال گلوکز به N-terminus از سلول‌های بتا، توسط یک Keto amino مربوط است که گلیکوزیله شدن نام دارد و در شرایط دیابتی افزایش می‌یابد. HbA<sub>1c</sub>، متوسط قند خون بیمار، در ۲ یا ۳ ماه قبل است. نشان داده شده که هر ۱٪ کاهش در هموگلوبین گلیکوزیله، به کاهش ۳۷٪ عوارض دیابتی و ۲۱٪ مرگ‌ومیر در دیابت منجر می‌شود (Cisneros et al, 2011). افزایش سطح گلوکز منجر به گلیکوزیله شدن پروتئین‌ها، لیپو پروتئین‌ها و آپولیپوپروتئین‌ها می‌شود و خطر عوارض جانبی مانند کاهش تراکم استخوان‌ها، چاقی و بیماری‌های قلبی-عروقی را افزایش می‌دهد (Kartick et al, 2014). کنترل گلیکوزیله شدن از طریق مهار آنزیم آلفاگلوکوزیداز، بسیار مهم است. این آنزیم، روی نشاسته اثر می‌کند و آن را به دی‌ساکارید مالتوز و سپس به گلوکز تجزیه می‌کند (Manu kumar et al, 2017).

#### ۲-۵-۱-۲- استرس اکسیداتیو

شایع‌ترین عارضه دیابت ملیتوس، تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS<sup>۴</sup>) است که به علت سطوح بالای گلوکز، اختلالات متابولیکی و عوارض مزمن به وجود می‌آورد. ROS باعث تخریب سلول‌های بتا و ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی، باعث آسیب رسیدن به کبد و کلیه شده و عملکرد آنها را مختل می‌کند. همچنین سطح سرمی اوره و کراتینین افزایش می‌یابد که اختلال در عمل فیلتراسیون گلومرولی است (Abtahi et al, 2017). نوروپاتی، طیف گسترده‌ای از اختلال عملکرد بیماری کلیه است که باعث آسیب کلیه می‌شود. استرس اکسیداتیو نقش حیاتی در پاتوژنز کلیه دارد و بافت کلیه، حساس به اثرات زیان آور گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) است. نوروپاتی ناشی از اختلال عملکرد کلیه، از طریق عوامل خطر مانند دیابت و فشار خون، ایجاد می‌شود. علاوه بر این، نوروپاتی دیابتی (DN)، یکی از عوارض اصلی دیابت نوع ۱ است که منجر به پیشرفت بیماری کلیوی در دیابت نوع ۱ و دیابت نوع ۲ می‌شود (Hasanvand et al, 2018). مطالعات نشان

4. Reactive oxygen species

داده که، بیماری کلیه دیابتی پس از هیپرگلیسمی رخ می‌دهد. تجمع Ros، در این بیماری در اثر استرس اکسیداتیو، موجب افزایش غلظت گلوکز می‌شود، علاوه بر این نفوذ پذیری عروقی توسط هیپرگلیسمی در گلوامرول‌های کلیه افزایش می‌یابد.

## ۲-۲- آلوکسان و القای دیابت

آلوکسان مونوهیدرات دارویی است که در القای دیابت آزمایشگاهی در مدل حیوانی استفاده می‌شود و به صورت تزریق داخل وریدی، داخل صفاقی و یا زیر پوستی باعث ایجاد دیابت وابسته به انسولین می‌شود. جزایر لانگرهانس در پانکراس انسان نسبت به آلوکسان مقاوم است. در موش‌های صحرایی با تزریق  $150 \text{ mg/kg}$  آلوکسان، دیابت القاء می‌شود. آلوکسان باعث ایجاد هیپرلیپیدمی می‌شود یعنی افزایش قابل توجهی در میزان چربی موجود در موش‌های دیابتی ایجاد می‌کند. آلوکسان ماده‌ای هیدروفیل و ناپایدار است و نیمه عمر آن در PH خنثی و دمای  $37^\circ\text{C}$ ، حدود  $1/5$  دقیقه و در دمای پایین‌تر طولانی‌تر است. این ماده از اکسیداسیون اوریک‌اسید بدست می‌آید و شکل دارویی آن بصورت پودر بوده و به آسانی در آب حل می‌شود. هنگامی که از دوز دیابتی استفاده می‌شود، جذب سریع آن توسط سلول‌های بتا اتفاق می‌افتد و دیابت نوع ۱ بوجود می‌آید. جذب آلوکسان در کبد نیز اتفاق می‌افتد، اما کبد و دیگر بافت‌ها مقاومت بیشتری در مقایسه با سلول‌های بتا دارند و آنها را در مقابل سمیت آلوکسان محافظت می‌کند. نشان داده شده که آلوکسان موجب افزایش ناگهانی ترشح انسولین در حضور یا عدم حضور گلوکز می‌شود (Afifi et al, 2015). انتشار انسولین ناشی از آلوکسان، با این روش مدت کوتاهی طول می‌کشد و به دنبال آن، سرکوب کامل واکنش سلول‌های پانکراس به گلوکز است. افزایش ناگهانی در ترشح انسولین از سلول‌های بتا به دنبال حضور آلوکسان، ممکن است ناشی از افزایش غلظت داخل سلولی یون کلسیم در این سلول‌ها باشد. بالا بودن این یون به همراه Ros تشکیل شده در اثر حضور آلوکسان در داخل سلول، باعث آسیب سلول‌های بتا می‌شود. دیابت آلوکسانی با توجه به تخریب و نکروز شدن بافت پانکراس مشابه دیابت نوع ۱ است (Afifi et al, 2015).

### ۲-۲-۱- مکانیسم عمل آلوکسان

یک مرحله مهم در عمل دیابت‌زایی آلوکسان، تغییر هموستاز کلسیم داخل سلولی است، به این ترتیب که باعث افزایش میزان کلسیم آزاد سیتوزولی در سلول‌های بتای پانکراس می‌شود که به دلایل زیر است:

۱- ورود کلسیم به داخل سلول بر اثر حضور آلوکسان ۲- خروج کلسیم از ذخایر داخل سلول مانند میتو کندری و شبکه آندوپلاسمی ۳ - محدود شدن حذف کلسیم از سیتوپلاسم سلول.

ورود کلسیم به داخل سلول می‌تواند به دلیل توانایی آلوکسان در دپلاریزه کردن سلول‌های بتا باشد. در این حالت کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ در اثر دپلاریزه شدن غشای سلولی باز شده و منجر به ورود کلسیم به داخل سلول می‌شود (Szkudelski et al, 2001). رادیکال هیدروکسیل، بیشترین اثر تخریبی را بر روی سلول‌های بتا دارد. عمل اکسیژن واکنشی (Ros) با افزایش غلظت کلسیم آزاد سیتوزول باعث تخریب سریع سلول‌های بتای پانکراس می‌شود و هیپرگلیسمی و عدم ترشح انسولین در پلاسمای آن‌ها دیده می‌شود (Szkudelski et al, 2001).

### ۲-۳- کبد و آنزیم‌های کبدی

کبد بزرگترین غده بدن است که در فعالیت‌های سوخت‌وساز بدن و در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها نقش دارد. در بسیاری از محصولات گوارشی به جز لیپیدها، مواد جذب شده از روده به طور مستقیم و از طریق سیاهرگ باب کبدی وارد کبد می‌شوند. از دیگر کارهای کبد به دام انداختن سموم و تصفیه آن‌ها، متابولیسم داروها، شرکت در خون‌سازی در دوره جنینی و ذخیره آهن می‌باشد. کبد، مواد زائد متابولیسم را از طریق فرایندهایی مانند دامیناسیون آمینواسید، سم‌زدایی و اوره تولید می‌کند. در ارتباط با طحال در تخریب گلبول‌های قرمز و احیای اجزای آن نقش دارد و مسئول تولید و ترشح صفرا است. سلول‌های کبدی، پروتئین‌هایی مانند پروترومبین، آلبومین، لیپوپروتئین و هپارین را ذخیره می‌کنند. کبد به عنوان سیستم بافری مهم برای گلوکز خون عمل می‌کند و جایگاه اصلی کلیرنس انسولین به شمار می‌رود. با ذخیره گلوکز به عنوان گلیکوژن (گلیکوژنز)، سطح قند خون را پایدار نگه می‌دارد. هنگامی که غلظت گلوکز خون بعد از صرف غذا بالا می‌رود، میزان ترشح انسولین نیز از پانکراس افزایش می‌یابد و حدود دو سوم گلوکز جذب شده از روده، به گلیکوژن تبدیل و در کبد ذخیره می‌شود. در طی ساعات بعد که گلوکز خون و نیز انسولین کاهش می‌یابد، کبد گلیکوژن را تجزیه و به گلوکز تبدیل می‌کند یعنی گلیکوژنولیز انجام می‌دهد و از منابع غیر کربوهیدرات مانند آمینواسیدها، گلوکز ایجاد می‌کند (گلوکونئوژنز). بنابراین

کبد نقش مهمی در حفظ سطح گلوکز در هنگام گرسنگی و بعد از غذا خوردن ایفا می- کند (Giannini et al, 2005).

### ۱-۳-۲- آنزیم‌های کبدی

گام اولیه در تشخیص آسیب کبدی، یک آزمایش خون ساده برای تعیین سطح آنزیم‌های خاصی در خون است. در شرایط عادی این آنزیم‌ها درون سلول‌های کبدی قرار دارند اما زمانی که کبد به هر دلیلی آسیب دیده باشد به جریان خون ریخته می‌شوند. فعالیت‌های شدید آمینوترانسفرازهای سرم، علامت شایع بیماری کبد است و بیشتر در افراد مبتلا به دیابت دیده می‌شود.

### ۱-۳-۲-۱- آلانین آمینو ترانسفراز (ALT)

این آنزیم به عنوان ترانس‌آمیناز پیروویک گلوتامیک سرم (SGPT) نیز شناخته می‌شود، مشخص‌کننده و مارکر ویژه عملکرد کبدی بوده، درهپاتوسیت‌های کبدی یافت می‌شود و نیز به مقدار کمتری در قلب، کلیه و عضله اسکلتی یافت می‌شود و به علت آسیب کبدی وارد جریان خون می‌شود. بنابراین آن را به عنوان یک شاخص نسبتاً مشخص از وضعیت کبد در نظر می‌گیرند (Ahn et al, 2014). ALT کاتالیزورهای قابل برگشت بین L آلانین و آلفاکتوگلو تارات را برای تشکیل پیروات و L گلو تانات کاتالیز می‌کند، بنابراین نقش مهمی در گلوکونئوژنز و نیز در متابولیسم آمینواسیدها دارد. مطالعات متعددی، ارتباط ALT با دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک را نشان داده است. همچنین ALT یک نشانگر قابل قبول برای استئاتوز کبدی است. استئاتوز کبدی به عنوان بیماری کبد چرب غیر الکلی<sup>۵</sup> (NAFLD) نامیده می‌شود. در سال‌های اخیر NAFLD به عنوان یک عامل بیماری‌زا، در مقاومت به انسولین و دیابت نوع ۲ شناخته شده است و در اکثر موارد، باعث افزایش بدون علامت سطح آنزیم‌های کبدی، AST, ALT و GGT می‌شود. از بین این آنزیم‌ها، ALT، بیشترین ارتباط را با چربی کبدی دارد و به عنوان یک نتیجه از آسیب هپاتوسیت‌های کبدی در اثر استئاتوز کبدی است. در نتیجه، این آنزیم به عنوان نشانگر NAFLD استفاده شده است (Schindhelm et al, 2006).

---

<sup>5</sup>. Non Alcoholic Fatty Liver Disease

## ۲-۱-۳-۲- آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST)

به عنوان ترانس آمیناز گلوتامیک اگزالواستیک سرم (SGOT) نیز نامیده می‌شود. بطور معمول در انواع بافت‌ها از جمله کبد، قلب، ماهیچه، مغز و گلبول‌های قرمز یافت می‌شود و اگر هر یک از این بافت‌ها آسیب دیده باشند به سرم آزاد می‌شود. بنابراین به عنوان شاخص بسیار خاص برای آسیب کبدی نیست زیرا افزایش آن می‌تواند به عنوان نتیجه‌ای از سایر بافت‌های آسیب دیده نیز باشد. AST در عضله قلب، صاف و اسکلتی یافت می‌شود و ممکن است در انفارکتوس میوکارد و یا بیماری میوزیت نیز افزایش یابد (Chiang et al, 2014).

## ۳-۱-۳-۲- گاما گلو تامیل ترانسفراز (GGT) (γGT)

این آنزیم در سلول‌های هیپاتوسیت، سلول‌های اپی تلیال، لوله‌های کلیوی، پانکراس و روده وجود دارد. سطح بالای آن ممکن است در بیماری مزمن انسداد ریوی و نارسایی کلیه مشاهده شود و ممکن است چند هفته بعد از انفارکتوس حاد قلب وجود داشته باشد. علاوه بر این در بیماری مزمن کبدی و آسیب‌های مجرای صفراوی، افزایش GGT ممکن است وجود داشته باشد. GGT، یک آنزیم میکروسوم است و فعالیت آن توسط داروهای مختلف مانند داروهای ضد انعقادی و ضد بارداری خوراکی القا می‌شود. افزایش سطح این آنزیم در بیماران مزمن کبدی، با آسیب و فیبروز مجرای صفراوی همراه است، بنابراین می‌تواند برای شناسایی علت تغییرات آنزیم ALP، مفید باشد (Ahn et al, 2014). هنگامی که جریان صفرا کم می‌شود و یا مجرای صفراوی بسته می‌شود، آنزیم‌های ALP و GGT در کبد افزایش می‌یابد و اگر مقدار آنها در خون بالا باشد می‌تواند به علت مشکل کبدی و مجاری کیسه صفرا باشد.

## ۴-۱-۳-۲- آلکالین فسفاتاز (ALP)

آنزیم کبدی است اما در استخوان و به مقدار کمتری در روده، کلیه و گلبول‌های سفید وجود دارد. در سه ماهه سوم بارداری، در ناحیه جفت و در دوره نوجوانی، در ناحیه استخوان افزایش سطح ALP سرم وجود دارد. افزایش سطح پاتولوژیک ALP، ممکن است نه تنها در بیماری کبدکلیستاتیک (مانند انسداد کامل مجاری صفراوی و یا انسداد کامل داخل کبدی از جمله متاستاز) باشد، بلکه در بیماری استخوانی مانند متاستاتیک استخوانی، کمبود ویتامین D و در شکستگی استخوان نیز افزایش می‌یابد. افزایش ALP

همچنین ممکن است به دلیل کلستاز ناشی از احتقان کبدی باشد که آن هم ناشی از نارسایی سمت راست قلب است. نیمه عمر در گردش خون ALP حدود یک هفته است و این ویژگی توضیح می‌دهد که چرا سطح این آنزیم معمولاً در مجاری صفراوی که دچار انسداد شده‌اند، افزایش می‌یابد و پس از آن به آرامی کاهش می‌یابد. بنابراین آلکالین فسفاتاز در دیواره مجاری صفراوی کبد یافت می‌شود، همچنین در استخوان وجود دارد و در آسیب بافت استخوانی نیز افزایش نشان می‌دهد (Giannini et al, 2005).

### ۲-۳-۲- تغییرات آنزیم‌های کبدی در دیابت

فعالیت‌های شدید آمینوترانسفرازهای سرم نشانه‌ی شایع بیماری کبد است و بیشتر در افراد مبتلا به دیابت دیده می‌شود. بسیاری از مطالعات ارتباط بین عوارض دیابت و اختلالات در بافت‌های مختلف مانند نوروپاتی دیابتی و بیماری‌های قلبی - عروقی را نشان داده‌اند. اما در مورد ارتباط احتمالی عوارض دیابت و عملکرد کبدی اطلاعات محدودی وجود دارد (Arkkila et al, 2001). در مطالعه‌ای بر روی بیماران دیابتی نوع ۱، فعالیت ALT، با نوروپاتی همراه بود و ارتباط بین فعالیت GGT و نوروپاتی نیز وجود داشت. همچنین فعالیت GGT به شدت با رتینوپاتی همراه بود. بنابراین عوارض دیابت، مانند رتینوپاتی و نوروپاتی با فعالیت آنزیم‌های کبدی همراه است (Arkkila et al, 2001). در واقع اختلال کبدی ناشی از مقاومت به انسولین ممکن است منجر به توسعه دیابت نوع ۲ شود (Ahn et al, 2014). مطالعات نشان داده، دیابت منجر به کاهش متابولیسم کبد و افزایش آنزیم‌های آن می‌شود (Abtahi et al, 2017).

### ۲-۳-۳- سایر علل تغییرات آنزیم‌های کبدی

AST و ALT آنزیم‌هایی هستند که انتقال گروه  $\alpha$ -آمینو را از آسپارات و آلانین به گروه  $\alpha$  کتو، در اسید کتوگلووتاریک کاتالیز می‌کنند، تا به ترتیب اگزوالوستیک و پیروویک اسید تولید کنند. هر دو این آنزیم‌ها برای انجام این واکنش نیاز به پیریدوکسال ۵ فسفات (ویتامین B<sub>6</sub>) دارند. در بیماران مبتلا به کبد الکلی، کمبود پیریدوکسال ۵ فسفات ممکن است فعالیت ALT سرم را کاهش دهد و افزایش نسبت AST به ALT در این بیماران مشاهده می‌شود (Giannini et al, 2005). از علل کمتر رایج آنزیم‌های غیرطبیعی کبدی، بیماری سلیاک، بیماری ویلسون و هپاتیت خود ایمنی است. با وجود اینکه هپاتیت C خیلی رایج نیست اما، هپاتیت B می‌تواند بیماری کبدی را

با آنزیم‌های غیر طبیعی کبدی ایجاد کند. بیماری ویلسون، یک اختلال ارثی است که باعث انباشت بیش از حد مس در بافتهای مختلف از جمله کبد و مغز می‌شود. مس بیش از حد، می‌تواند منجر به التهاب مزمن کبد شود. بیماری سلیاک یک اختلال خود ایمنی است که با فرکانس بیشتر در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۱ رخ می‌دهد. سلیاک بیماری روده کوچک است که در آن فرد حساسیت به گلوتن دارد و علائم آن سوء تغذیه ناشی از سوء جذب و هیپوگلیسمی ناشناخته است و سطح ALT و AST بطور غیرطبیعی افزایش می‌یابد. در افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ و بیماری سلیاک، رژیم غذایی بدون گلوتن، باعث کاهش علائم و کاهش میزان هیپوگلیسمی می‌شود (Chiang et al, 2014).

#### ۴-۲- گالگا (*Galega officinalis*)

گیاه سنتی چند ساله، ساقه آبدار و سبز، برگ‌های سبز و گل‌های سفید، آبی یا بنفش و در اکثر مناطق معتدل و کم ارتفاع رشد می‌کند.



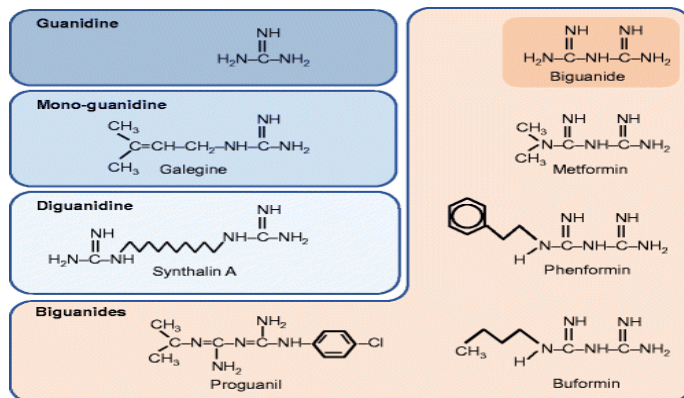
شکل ۲-۱: گیاه گالگا (Bailey, 2017)

گالگا، گیاه علفی از خانواده لگومینه یا باقلانیان (*Fabaceae*) است. این گیاه با عنوان غم بز (*Goat's rue*) نیز نامیده می‌شود. به علت اینکه بزهایی که از این گیاه می‌خورند، دچار کاهش شدید قند خون شده و می‌مردند. همچنین به عنوان سوزن فرانسوی و یا استاد علف هرز نیز نامیده می‌شود (Shojaee et al, 2015).

#### ۴-۲-۱- ترکیب شیمیایی گالگا

این گیاه غنی از ترکیب فیتوشیمیایی گوانیدین و گالگین است. مشتقات گوانیدین شامل ۱- *monoguanidin* (galegin) ۲- *diguanidin* (synthalin) ۳- *Biguanides*

(تشکیل شده از دو مولکول گوانیدین و مشتقات آنها متفورمین است). در سال ۱۹۱۸ نشان داده شد که گوانیدین دارای فعالیت هیپوگلیسمی در حیوانات است. با این حال مشتقات مونوگوانید و دی گوانید بسیار سمی هستند. ترکیب دو گوانیدین به شکل Biguanides توسط ورمز و بل در سال ۱۹۲۲، زمینه را برای سنتز متفورمین (دی متیل بیگوانید) فراهم کرد. از این رو بیگوانید برای درمان دیابت، توسعه یافت (Bailey et al, 2004).



شکل ۲-۲: مشتقات گوانیدین (Bailey, 2017)

## ۲-۴-۲- متفورمین (دی متیل بیگوانید)

فرمول متفورمین برای اولین بار در سال ۱۹۵۸ در انگلستان در دسترس قرار گرفت. متفورمین خاصیت ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد مالاریا دارد. در واقع یک دی متیل بیگوانید است که خاصیت ضد هیپرگلیسمی دارد و کاهش قند خون را با کاهش تولید گلوکز در کبد و با افزایش جذب گلوکز در عضلات اسکلتی و آدیپوست، انجام می-دهد (song et al, 2016). گزارش شده که ترکیب متفورمین و انسولین، کنترل متابولیک دیابت نوع ۲ را بهبود می بخشد و عوارض آن را کاهش می دهد. مطالعات نشان می دهد که متفورمین، غلظت گلوکز را کاهش داده و سندرم متابولیک کاهش می یابد. همچنین در اختلالات متابولیسم کربوهیدرات و در درمان سندرم تخمدان پلی کیستیک (Pcos) تجویز می شود (Bailey et al, 2017).



### ۳-۴-۲- اثرات محافظتی متفورمین

مطالعات نشان داده که متفورمین ممکن است اثرات محافظتی روی سلول‌های کلیه در برابر عواملی داشته باشد که باعث ایجاد سمیت در کلیه‌ها و نفروپاتی در اثر دیابت می‌شود. بیماری کلیوی ناشی از دیابت با تولید گونه‌های اکسیژن واکنش (ROS) و آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده سلول) شروع می‌شود و گلوکز خون بالا، آپوپتوز را افزایش می‌دهد. داروی متفورمین با متوقف ساختن و کاهش آپوپتوز، سلول‌های tubular و پودوسیت‌ها را حفظ می‌کند، بهترین انتخاب درمانی برای بیماران مبتلا به بیماری کلیوی دیابتی است. اثر محافظتی متفورمین از لوله‌ها و پودوسیت‌ها، از طریق کاهش ROS داخل سلولی در برابر استرس اکسیداتیو است (Darabi et al, 2018). نتایج استفاده از متفورمین، اثرات محافظتی این دارو را در برابر مشکلات کبدی و بیماری کلیوی ثابت کرده است.

### ۴-۴-۲- اثرات گالگا بر دیابت

گزارش‌های مختلفی درباره خواص دارویی این گیاه مانند دیورتیک، ضد باکتری و اثر ضد درد وجود دارد. نتایج مطالعات نشان داده که درمان با عصاره گالگا می‌تواند باعث محافظت از بافت کلیه شده و آسیب بافتی ناشی از استرس اکسیداتیو مربوط به دیابت را کاهش دهد. همچنین طی تحقیقات انجام شده تأثیر گالگا بر کاهش وزن مشاهده شده است. مکانیسم عمل کاهش وزن گالگا نامشخص است، اما شامل کاهش چربی خون می‌شود (palit et al, 1999).

### ۵-۴-۲- سندرم تخمدان پلی کیستیک و دیابت

سندرم تخمدان پلی کیستیک<sup>۶</sup> (PCOS) یک اختلال غدد درون‌ریز و متابولیک بسیار شایع است که با هیپرآندروژنیسم و بی‌نظمی قاعدگی، آمنوره، هیرسوتیسم و ناباروری و مقاومت به انسولین، هیپرانسولینمی، چاقی و سطوح بالای هورمون‌های مردانه (آندروژن‌ها) همراه است. سندرم تخمدان پلی کیستیک و دیابت نوع ۲ (T2D) هر دو بیماری مرتبط با چاقی هستند. در T2D، مقاومت به انسولین، موجب ناتوانی سلول‌های بتا و در نهایت باعث خنثی شدن انسولین با دیس‌گلیسمی ناشی از آن می‌شود. اعتقاد بر این است که

6. polycystic ovary syndrome

Title and Author:	<b>Investigation of the Effects of Silver Nanoparticles Using <i>Galega officinalis</i> on Hematology and Serum Levels of Liver Enzymes in Alloxan Induced Diabetes in Rat Model / Fariba Azimi</b>
Supervisor:	<b>Dr. Fariba Mahmoudi</b>
Graduation date:	<b>2019/03/09</b>
Number of pages:	94

### **Abstract**

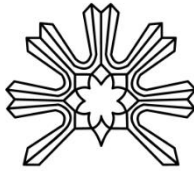
**Research Aim:** *Galega officinalis* is one of the best medicinal plants for treatment of diabetes due its component similarity to metformin. Chronic diabetes is associated with damage of liver and kidney functions, changes of hematological parameters including decreasing the white blood cells(WBC), platlets and dysfunction of red blood cells(RBC). Silver nanoparticles are important components in biological studies due to their antioxidant, antibacterial, antihyperglysemic properties and so on. Green synthesis of silver nanoparticles using plants extrats in addition to the lower cost of the synthesis process, results in smaller nanoparticles and bettere performance than chemichal synthesis. In the present study, for the first time the effects of silver nanoparticles synthetized using aerial parts of *Galega officinalis* were determined on hematological parameters and serum levels of liver enzymes in diabetic rats.

**Research method:** In the present study thirty male Wistar rats in six group(n= 5 in each group) weighing 180- 200 g were used. Intact or alloxan monohydrate(150mg/Kg) -induced diabetic rats received intraperitoneal injection of saline or 2/5mg/Kg silver nanoparticles synthetized by *Galega officinalis* extract or chemichal method for 14 days respectively. One day following the last injection of drugs, Blood samples were collected in overnight fasted rats. Mean serum concentration of glucose, urea, creatinine, albumin, alanine amino transferase(ALT), aspartate amino transferase(AST), gamma glutamil transpeptidase GGT( $\gamma$ GT) and alkaline phosphatase(ALP) were determined by spectrophotometry using global 240 biochemistry analyzer. glycated hemoglobin(HbA1C) percentage was determined by Cobas Mira analyzer. Hematological parameters were determined by using XS800i Sysmex automated hematology analyzer. The data were analyzed by one way- ANOVA test followed by post hoc Duncan test and SPSS software.

**Findings:** Mean serum levels of glucose and urea significantly decreased in diabetic rats receiving chemichal or green silver naoparticles compared to diabetic ones. Mean serum levels of ALT and AST enzymes significantly decreased in diabetic rats receiving green silver naoparticles compared to diabetic ones. Mean serum levels of ALT enzyme did not significantly decrease in diabetic rats receiving chemichal silver naoparticles compared to diabetic ones. Mean serum levels of AST enzyme significantly increased in diabetic rats receiving chemichal silver naoparticles compared to diabetic ones. Mean hemoglubin concentration and hematocrit percentage did not significantly increase in diabetic rats receiving green silver naoparticles compared to diabetic ones. Mean serum levels of GGT(  $\gamma$ GT), ALP, and AST enzymes, mean white blood cells(WBC) number and HbA1C percentage significantly decreased in diabetic rats receiving chemichal or green silver naoparticles compared to diabetic ones. Mean serum levels of albumin significantly increased in diabetic rats receiving chemichal or green silver naoparticles compared to diabetic ones. The decrease of mean serum level of creatinin, the increase of mean red blood cells(RBC) and platlets number were not statistically significant in diabetic rats receiving chemichal or green silver naoparticles compared to diabetic ones.

**Conclusion:** Both chemical and green synthetized silver nanoparticles caused effective decrease in blood glucose levels of diabetic rat. However, Silver nanoparticles synthetized using *Galega officinalis* extraxt may be more protective than chemical synthetized one in regulation liver function. It may decrease the serum levels of liver enzymes partlty via preventing hepatocytes damage in diabetes. Also, it may be effective in the treatment of cardio-vascular disorders associated with cronic diabetes by improving the hematological parameters.

**Keywords:** *Galega officinalis*, silver nanoparticle , liver enzymes, hematological parameters



University of Mohaghegh Ardabili  
Faculty of Sciences  
Department of Biology

Thesis submitted in partial fulfillment for the degree of  
M.Sc. in Biology

**Investigation of the Effects of Silver  
Nanoparticles Using *Galega officinalis* on  
Hematology and Serum Levels of Liver  
Enzymes in Alloxan Induced Diabets in Rat  
Model**

By:

**Fariba Azimi kodeh kahriz**

Supervisor:

**Fariba Mahmoudi (Ph.D)**

Advisor:

**Farzaneh Mahmoudi (Ph.D)**

**Septamber2019**