مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٤, شمـاره‌ی ۱۰٤, مرداد و شهریور ۱۳۹۵, صفحات ۸۳ تا ۹۳

بررسی اثرعصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار (Peel Pomegranate) بر پارامترهای بیوشیمیایی خون موش‌های صحرایی نر دیابتی، عفونی با کاندیدا آلبیکنس

مجید صادق پور[۱]، دکتر فاطمه نوربخش[۲]

نویسنده‌ی مسوول: گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران majid_sadeghpoor@yahoo.com

دریافت: ۹٤/۱/۱۷ پذیرش: ۹٤/۵/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: *پوست انار حاوی مقادیر فراوانی از ترکیبات گلیکوزیدی، فلاونوئیدی وآنتوسیانین‌ها می‌باشد. امروزه استفاده از گیاهان دارویی به دلایل ارزان بودن، عوارض جانبی کم، داشتن ترکیبات موثر و متنوع افزایش یافته است. کاندیدا آلبیکنس به‌عنوان شایع‌ترین عامل عفونت دهانی در افراد دچار نقص سیستم ایمنی و افراد مبتلا به دیابت می‌باشد. تحقیق حاضر جهت بررسی اثرات پوست انار بر برخی پارامترهای خونی (کراتینین، اوره، پروتئین تام، آلبومین و آنزیم‌های کبدی AST و ALT و ALP) در موش صحرایی آلوده به قارچ کاندیدا آلبیکنس انجام شده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی تجربی ۳۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار به شش گروه پنج تایی تقسیم شدند. در گروه کنترل پس از دیابتی شدن آلودگی تجربی با خوراندن دوز عفونی قارچ کاندیدا آلبیکنس به کمک سوزن گاواژ ایجاد شد و به دنبال تیمار با عصاره محلول در آب آشامیدنی ایتراکنازول تحت درمان قرار گرفتند. در چهار گروه دیگر دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره‌ی پوست انار به‌مدت ۷ روز به‌صورت محلول در آب آشامیدنی به‌طور ۲٤ ساعته به موش‌ها داده شد،سپس قدرت اثرگذاری این عصاره با داروی ضد قارچ ایتراکونازول مقایسه گردید.*

یافته‌ها: *نتایج حاصله افزایش معنی‌داری را در غلظت پلاسمایی آلبومین و پروتئین تام نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P<۰/۰۱$). آنزیم‌های کبدی به‌صورت وابسته به دوز غلظت عصاره، تغییرات کاهشی یافتند ($P<۰/۰۰۱$). میانگین داده‌های حاصله با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه یا ANOVA و تست تعقیبی Tukey مورد ارزیابی آماری قرار گرفت.*

نتیجه گیری: *نتایج حاصله از این تحقیق بهبود ضایعات قارچی کاندیدیازیس دهانی و افزایش ترمیم بافت مخاطی را بعد از تجویز عصاره هیدروالکلی پوست انار نشان می‌دهد. ولی به علت وجود فلاونوئیدها و آلکالوئیدها در خانواده‌ی گیاهان پونیکاسه بر الگوی پارامترهای بیوشیمیایی سرم تاثیر نامطلوب گذاشته و باعث ایجاد اختلال در عملکرد اندام‌های حیاتی بدن نظیر: کبد، کلیه می‌شود بنابراین می‌توان از این عصاره به صورت دهان شویه در افراد مبتلا به دیابت و یا نقص ایمنی در جهت بر طرف نمودن ضایعات مختلف دهانی استفاده کرد ولی از مصرف آن به صورت خوراکی باید پرهیز نمود.*

واژگان کلیدی: ***پوست انار، موش‌های صحرایی، کاندیدا آلبیکنس، آنزیم‌های کبدی و پارامترهای کلیوی***

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران
۲- دکترای تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین

مقدمه

دیابت به‌عنوان فاکتور اصلی و مهم ابتلا به عفونت‌های قارچی است. در فرآیند دیابت، دوره‌های طولانی هیپرگلیسمی می‌تواند منجر به تولید رادیکال‌های آزاد به‌ویژه ROS (Reactive Oxygen Species) شود. این نشان دهنده‌ی اکسیداسیون گلوکز و گلیکوزیله شدن پروتئین می‌باشد و شرایط نامناسب در همه‌ی بافت‌ها می‌تواند تعادل بین تولید ROS و مکانیسم دفاعی سلول را مختل نماید (۱). دیابت ملیتوس بیماری متابولیکی است که با افزایش مزمن گلوکز خون واختلال در متابولیسم قندها، چربی‌ها و پروتئین‌ها مشخص می‌شود (۲). بیماری دیابت با عوارض طولانی مدت شامل رتینوپاتی، نفروپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی عروقی همراه است (۳). تخمین زده می‌شود در حال حاضر بیشتر از ۳/٦ درصد از جمعیت دنیا مبتلا به بیماری دیابت ملیتوس باشند (٤). امروزه مصرف گیاهان دارویی به دلایل ارزان بودن، عوارض جانبی کم، داشتن ترکیبات موثر و متنوع افزایش یافته است. ترکیبات گیاهان دارویی از گذشته در درمان دیابت قندی و عوارض ناشی از آن مطرح بوده است، ولی در مورد اثربخشی قطعی بسیاری از آن‌ها تاکنون شواهد تحقیقاتی و معتبر یافت نشده است (۵). داروهای شیمیایی عمدتا با تقلید از فرمول‌های داروهای گیاهی اما به صورت مصنوعی در آزمایشگاه‌ها تهیه می‌شوند، ولی اخیرا مشخص شده است، در صورتی که برخی از انواع ترکیبات موجود در گیاهانی که در آزمایشگاه‌ها به صورت خالص تهیه می‌شوند، همراه با سایر ترکیبات موجود در گیاه به مصرف برسند، عوارض جانبی آن‌ها کاهش یافته و تنها اثرات مفید آن‌ها در شخص آشکار می‌شود (٦).

گیاهان دارویی دارای مواد طبیعی هستند که احتمال عوارض جانبی آن‌ها کمتر است. بسیاری از این گیاهان دارای منابع غنی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی هستندکه می‌توانند اثرات ناشی از اکسیدان‌ها یا عوارض برخی از بیماری‌ها را کاهش دهند. اخیرا تمایل زیادی در تشخیص ترکیبات آنتی اکسیدانی وجود دارد که دارای توان فارماکولوژیکی بدون اثرات جانبی یا حداقل با کمترین اثرات جانبی هستند و در پزشکی و صنایع غذایی اهمیت زیادی دارند (۷).

میوه‌ی انار متعلق به خانواده‌ی Punicaceae و دون خانواده‌ی Pomegranate بوده که در نواحی مختلف ایران از جمله: کاشان، ساوه، یزد، ورامین و در سایر کشورها نظیر اسپانیا، ایتالیا، یونان، مراکش، افغانستان، هندوستان، چین، ترکمنستان، روسیه و ازبکستان کشت می‌گردد (۹و ۸و ۷). این میوه در اواخر مهرماه تا اواخر آبان ماه آماده‌ی برداشت و مصرف می‌شود. دیر زمانی است که پوست میوه‌ی انار را به عنوان داروی گیاهی و قابض مورد استفاده قرار می‌دهند و عدم سمیت این ماده نیز به اثبات رسیده است. از آب انار در قدیم به عنوان تصفیه کننده‌ی خون نام می‌بردند. تمدن‌های کهن مصر، هند، چین و یونان این گیاه دارویی را شناخته بودند. مهم‌ترین اثراتی که برای انار در کتب سنتی عنوان شده، خاصیت قابض، ضدانگل، ضدسرطان، ضددیابت، ضدقارچی و ضد باکتری بوده همچنین مطالعات اخیر نشان داده، دانه‌های این گیاه دارای منابع غنی از آنتی‌اکسیدان می‌باشد (۱۱و۱۰).

مطالعات فیتوشیمیایی انجام شده نشانگر وجود آلکالوییدها، پلی فنل‌ها، فلاوونوییدها، آنتوسیانین‌ها، اسیدهای چرب و ویتامین‌ها است. در واقع آب انار یکی از غنی‌ترین منابع پلی‌فنل‌هاست که گروهی ازآنتی اکسیدان‌های قوی هستند. عمل آنتی اکسیدان‌ها کاهش یاجلوگیری از صدمه‌ی سلولی است که در بسیاری از بیماری‌ها رخ می‌دهد. انواع ترکیبات فنلی و تانینی موجود در پوست و میوه‌ی انار شامل: الاژیک اسید، گالیک اسید، پونیکالاژین، پونیکالین، کلروژنیک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید، پروتوکاتچیک اسید، هیدروکسی بنزوئیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، فلوریدزین، کوئرستین، کاتچین، پی- کوماریک اسید و او- کوماریک اسید می‌باشند. همچنین فلاوونوییدهای بسیاری موجود بوده که

شامل: لوتئولین، کامپفرول و نارین‌ژنین هستند و به صورت گلیکوزیدی یافت می‌شوند (۱۲).

ترکیب‌های فنولیک که به‌عنوان از بین برنده‌ی طبیعی اجرام میکروبی (باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها) هستند در پوست انار موجود است، به خصوص پونیکالاژین (Punicalagin) به‌دست آمده از پوست انار در این زمینه بسیار مفید است، با توجه به گزارش‌هایی که وجود دارد بهبودی و اثرات مفیدی بر روی عملکرد اندام‌های داخلی می‌گذارد (۱۳). بررسی‌های انجام شده بر روی موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان و ایجاد آلودگی تجربی با *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد که تجویز عصاره‌ی پوست انار در مواجهه با عفونت‌های قارچی وسایر عفونت‌های فرصت طلب با تغییرات بیوشیمیایی در سرم آن‌ها و بهبود برفک دهانی می‌تواند موثر باشد. از آن جایی که تاکنون در مورد خواص ضد دیابتی گل انار و دانه‌های خوراکی آن مطالعات زیادی صورت گرفته است (۱٤) ولی اثرات ضدقارچی (کاندیدیایی) و تاثیرات بیوشیمیایی پوست انار در موجود زنده (in vivo) بررسی نشده است، بنابراین در این مطالعه به خاصیت ضدقارچی عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار پرداخته و از طرفی به اثرات سوء آن به دنبال مصرف خوراکی پی می‌بریم.

روش بررسی

پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی تجربی می‌باشد که بر روی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد. در تمامی مراحل انجام این پژوهش مصوبات مربوط به اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس قانون مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. حیوانات در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم بوده و از دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) قسمت نگهداری و پرورش حیوانات آزمایشگاهی خریداری شد. حیوانات در دمای بین ۲۰ تا ۲٤ درجه‌ی سانتی‌گراد، در طول شبانه روز و رطوبت نسبی ٥± ٦۰ درصد قرار داده شدند (۱۲). حیوانات را ابتدا وزن کرده و سپس با تزریق درون صفاقی داروی آلوکسان مونوهیدرات از شرکت (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱٥۰ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن دیابتی شدند. پس از گذشت مدت ۳ تا ٥ روز، علایم دیابت مانند پرنوشی، کاهش وزن، افزایش حجم ادرار (پر ادراری) و پرادراری ظاهر شد. به منظور اطمینان از القای دیابت، گلوکز خون اندازه‌گیری شد. قند خون ناشتای بالاتر از ۱۸۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر نشان دهنده‌ی دیابت است (۱٥). پس از گذشت سه روز غلظت گلوکز خون اندازه‌گیری شد تا از دیابتی بودن آن‌ها اطمینان حاصل شود.

پوست میوه‌ی انار پس از جمع‌آوری و جداسازی دانه‌های انار از آن، در شرایط مناسب و مطلوب، در سایه و دمای اتاق قرار گرفت و بدین‌ترتیب پوست انارها خشک شد، مدت زمان لازم جهت انجام این عمل یک تا دو هفته بود (٦). پس از خرد نمودن به میزان ٥۰ گرم از پوست خشک شده‌ی انار را در ٤۸۰ سی‌سی متانول ۸۰ درصد به مدت ٤۸ تا ۷۲ ساعت در دمای اتاق و محلی به دور از نور خیسانده (روش ماسیراسیون)، سپس عصاره‌ی حاصل را با عبور دادن از کاغذ صافی واتمن ٤۲ صاف کرده و با استفاده از قیف شیشه‌ای و پمپ خلا، صاف کردن انجام شد. با به کارگیری دستگاه روتاری، حلال آن یعنی متانول جدا گردید. عصاره‌ی به دست آمده رقیق بود به‌همین علت محلول درون بن ماری ٦۰ تا ٦٥ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن برای ادامه‌ی تغلیظ کردن و جذب رطوبت احتمالی عصاره را داخل دسیکاتور حاوی مواد جاذب رطوبت قرار داده و نهایتا آن را در فالکون پلاستیکی ریخته و در یخچال ۰ تا ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری گردید.

یک سی‌سی از سوش استاندارد قارچی (ATCC۱۰۲۳۱) که ۲٤ ساعت قبل از آزمایش در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شده بود و به حالت فعال درآمده و غلظتی معادل

۰/۵ مک‌فارلند (cfu/ml ۱۰۸ × ۱/۵) از قارچ *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC۱۰۲۳۱) تهیه شد و به تمام حیوانات مورد بررسی با کمک سوزن گاواژ خورانده شد تا با این دوز عفونی مبتلا شوند. پس از گذشت ٤٨ تا ٧٢ ساعت از عفونی شدن تجربی موش‌ها (آلودگی با کاندیدا) با گرفتن سواپ مرطوب استریل دهانی و کشت دادن به روش کشت سطحی (Streak Plate Method) روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (SDA) میکروارگانیسم غالب در آن یعنی *کاندیدا آلبیکنس* دیده شد (٤) جهت اطمینان از عفونت تجربی ایجاد شده علاوه بر تکیه به نتایج کشت قارچ پس از نمونه برداری از موش‌ها در آزمایشگاه، تشخیص مجدد عامل عفونت حاصله، با بررسی تولید جرم تیوب ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* در سرم خرگوش و نیز تهیه لام مرطوب و نیز رنگ آمیزی اختصاصی (نیترات نقره، گرم) که از ابزارهای تشخیصی بوده‌اند تایید شد.

رشد این قارچ در محیط کروم آگار کاندیدا (از شرکت‌های مدیا) با ایجاد کلونی‌های سبز رنگ امکان افتراق از سایر عوامل کاندیدایی را فراهم آورد و در تایید عفونت تجربی موثر بود. برای بررسی، موش‌ها را به گروه‌های متعددی تقسیم‌بندی کردیم تا بتوانیم به ارزیابی غلظت‌های مختلف عصاره بپردازیم.

حیوانات آزمایشگاهی به ٦ گروه ٥ تایی تقسیم شده که گروه‌های مورد مطالعه عبارت بودند از:

گروه ۱: موش‌های صحرایی دیابتی که تیمار دارویی یا عصاره‌ی انار دریافت نکردند (n=٥).

گروه‌های ۲، ۳، ٤ و ٥: موش‌های صحرایی دیابتی عفونی شده با قارچ *کاندیدا آلبیکنس* که عصاره‌ی انار را در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند (n=۲۰).

گروه ٦: موش‌های صحرایی دیابتی عفونی شده با قارچ *کاندیدا آلبیکنس* که داروی ضد قارچ ایتراکونازول را به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت داشتند (n=٥). غلظت عصاره را برحسب مقدار عصاره در واحد میلی‌گرم بر وزن حیوان بر حسب کیلوگرم محاسبه کردیم. نحوه‌ی محاسبه به این صورت بود که با در نظر گرفتن محدوده‌ی وزنی موش‌ها با رعایت تناسب، غلظت انتخابی از عصاره وزن شده و در آب حل گردید، سپس در اختیار موش‌های صحرایی قرار داده شد تا تیمار با داروی گیاهی در طول مدت شبانه روز بر روی تمام گروه‌های مورد بررسی صورت گیرد (گروه‌های ۲، ۳، ٤ و ٥). سپس غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از آن تهیه شد و همچنین جهت مقایسه دارویی از گروه آزول‌ها داروی ایتراکونازول با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تهیه گردید و مورد ارزیابی قرار گرفت (گروه ٦).

اندازه‌گیری پارامترهای خون: در پایان آزمایش گروه‌های مختلف را با استفاده از داروی کتامین، بیهوش کرده و نمونه خون از قلب جمع‌آوری شد. پس از ایجاد لخته نمونه‌ها با دور ۲۵۰۰ و مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و سرم آن‌ها جهت بررسی و اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی به آزمایشگاه تشخیصی منتقل گشت. در آزمایشگاه همه‌ی تست‌های (کراتینین، اوره، پروتئین تام، آلبومین و آنزیم‌های آسپارتات آمینو ترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز) از سرم خون به روش کالری‌متری و توسط کیت پارس آزمون با بررسی و اطمینان از کالیبراسیون دستگاه و اطمینان از صحت خواندن نمونه‌های استاندارد انجام شد. انجام آزمایشات بیوشیمیایی با کمک دستگاه Auto Analyser BAYER 560 Express plus صورت گرفت و برای تست‌های مختلف از کنترل‌های استاندارد بیوشیمیایی تجاری نظیر Tru lab N و Randox استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور تجزیه و تحلیل آماری در این تحقیق به روش ANOVA (Analysis of variance)

(آنالیز واریانس یک طرفه) و از آزمون تعقیبی Tukey برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف استفاده شد. داده‌ها به صورت (میانگین ± خطای استاندارد) نشان داده شدند. آنالیز آماری به کمک نرم افزار SPSS و رسم نمودارهای مربوطه، به کمک نرم افزار Excel انجام شد. (P<۰/۰۵) به‌عنوان ملاک معنی‌دار بودن اختلاف بین گروه‌های آزمایش در نظر گرفته شد و مقادیر به‌دست آمده به صورت (میانگین ± خطای استاندارد) گزارش گردید.

یافته‌ها

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که مصرف عصاره‌ی پوست انار به‌صورت محلول در آب (خوراکی) در دوزهای مختلف سبب بر طرف شدن عوارض عفونت مخاطی گشته و تا حد قابل ملاحظه‌ای از التهاب دهانی موش‌ها می‌کاهد.

با افزایش غلظت این عصاره می‌توان کمک به حذف عامل پاتوژن کاندیدیایی کرد و با در نظر گرفتن محدوده‌ی زمانی مشخص، آن را قابل اجرا دانست. با افزایش غلظت عصاره در آب آشامیدنی سرعت روند بهبود بیماری افزایش و التهابات ناشی از عفونت کاهش یافت.

۱) پارامتر توتال پروتئین: در گروه تیمار (G2-G5) در مقایسه با گروه نرمال کاهش معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱). این فاکتور در گروه تیمار (G2-G5) نسبت به گروه کنترل افزایش از خود نشان داده است (P<۰/۰۱). مقایسه بین گروه ایتراکونازول (G6) با گروه نرمال دارای کاهش سطح می‌باشد جدول ۱ (P<۰/۰۵).

۲) پارامتر اوره: در موش‌های گروه تیمار (G2-G5) در مقایسه با گروه نرمال اختلاف معنی‌داری داشته و با افزایش این پارامتر بدین نحو همراه است (P<۰/۰۱). مقایسه‌ی گروه نرمال با گروه ایتراکونازول (G6) اختلاف معنی‌دار آن به صورت افزایش در این فاکتور بوده است (P<۰/۰۱). در مقایسه بین گروه تیمار (G2-G5) با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشته و با کاهش پارامترهمراه است که (P<۰/۰۵) می‌باشد (جدول ۱).

۳و٤) پارامترهای آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT): در نمونه آسپارتات آمینوترانسفراز موش‌های گروه تیمار (G2-G5) در مقایسه با گروه نرمال افزایش قابل قبولی را می‌توان مشاهده کرد (P<۰/۰۱)، ولی بررسی همین گروه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را از خود نشان نداده و از نظرآماری معنی‌دار نبود.

درگروه ایتراکونازول (G6) این سطح اختلاف با گروه نرمال افزایش معنی‌داری را به این صورت نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). تغییرات آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در موش‌های گروه تیمار (G2-G5) در مقایسه با گروه نرمال کاهش معنی‌داری داشته که می‌توان آن را به عملکرد عصاره‌ی گیاه و فعالیت هپاتوسیت‌ها درکبد نسبت داد (P<۰/۰۰۱).

در بررسی بین گروه تیمار (G2-G5) در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری به‌صورت افزایش مشاهده گردید (P<۰/۰۱). درگروه ایتراکونازول (G6) این سطح اختلاف چندان قابل بررسی نبوده و از نظر آماری معنی‌دار نبود.

۵) سطح آنزیمی پارامتر آلکالن فسفاتاز: در گروه تیمار (G2-G5) در مقایسه با گروه کنترل افزایش قابل بررسی دیده می‌شود که از نظر آماری به‌صورت (P<۰/۰۱) است که آن را می‌توان به اختلال عملکرد سلولی نسبت داد.

در مقایسه بین گروه تیمار (G2-G5) با گروه نرمال افزایش معنی‌داری را مشاهده کردیم (P<۰/۰۱). درمقایسه گروه ایتراکونازول (G6) با گروه نرمال افزایش معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۱).

٦) پارامتر آلبومین: مهم‌ترین پروتئین سرمی بوده و در مقایسه بین گروه تیمار (G2-G5) با گروه کنترل تغییراتی مشاهده نشد. اگرچه در مقایسه بین گروه کنترل با گروه نرمال تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد و از آن مقادیر

کمتر بود (P≤۰/۰۰۱). در مقایسه بین گروه ایتراکونازول (G6) و گروه نرمال افزایش معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱).

۷) پارامتر کراتینین: شاخص عملکرد کلیوی بوده و سطح پایین سرمی آن بیانگر کلیرانس صحیح بوده و جهت مقایسه بین گروه تیمار (G2-G5) با گروه کنترل تغییرات معنی‌دار آماری مشاهده نگردید.

در مقایسه بین گروه تیمار با گروه نرمال کراتینین بدون تغییر بود و همچنین در مقایسه بین گروه ایتراکونازول (G6) با گروه نرمال نیز فعالیت کلیه ثابت می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: اثر تجویز مقادیر مختلف عصاره هیدروالکلی پوست انار بر میزان فاکتورهای بیوشیمیایی خون در رت‌ها (۱۶)

پارامترهای خون	عصاره پوست انار (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)					ایتراکونازول(G6)	نرمال
	کنترل (G1)	۲۵ (G2)	۵۰ (G3)	۱۰۰ (G4)	۲۰۰ (G5)	۱۰mg/kg	
آلبومین (g/L)	۱/۷	۳/۳۰	۳/۳۲	۲/۸۰	۳/۱٤	۳/٥٤	۳/۸–٤/۸
پروتئین تام (g/L)	۳/۰۸	٦/٥٦	٦/۰۲	٥/۰	٦/٥٤	٥/٥٤	٥/٦-۷/٦
اوره (mg/dl)	۱۱۱/۱	۱۱۷/۳٤	۱۰٥/۳۸	۹۷/۹۲	۱۰۱/۹۲	۱۰۰/۹۲	۱۰-۲۱
کراتینین (mg/dl)	۰/٥٦	۰/۷٤	۰/٦۲	۰/٥٤	۰/٦٦	۰/٥۰	۰/٥-۱
آلکالین فسفاتاز ALP (U/L)	۲۲٦	۳۷٦/٤	۳٤۰/٤	۳۱٤/۲	۲٦۰/٤	۳٦۲/۲	٦۸ -۷۲/٥
آلانین آمینو ترانسفراز ALT (U/L)	٥۳/۸٦	۸۱/۰۲	۷۰/۷	٦۹/۱٥	۷٥/۱٦	٦۸/۷	۳٥-۸۰
آسپارتات آمینو ترانسفراز AST (U/L)	۱۲۰/۸	۱۳۲/٦۰	۱۲۰/٤	۱۱٦/٦	۹٦/۲	۱٥٦/۲	۳٥-۱۰۰

مقادیر نشان دهنده میانگین ± خطای معیار می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه آزمون تعقیبی توکی

بحث

کاندیدا آلبیکنس مخمری فرصت طلب بوده که در افراد دیابتی و افراد دچار نقص ایمنی می‌تواند پاتوژنی مهلک و کشنده باشد. عصاره‌ی پوست انار با دارا بودن خواص ضد قارچی و ضد باکتری و به علت حضور این مواد شیمیایی و ترکیبات مفید اثربخش است. مصرف این عصاره تغییرات بیوشیمیایی را در سرم موش‌های دیابتی شده مبتلا به کاندیدیازیس به دنبال دارد (۱٦).

این عصاره در جهت تقویت سیستم ایمنی اثرگذار بوده و در از بین بردن پاتوژن‌ها و جلوگیری از ایجاد بیوفیلم حاصله نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۷). با افزایش آنتی اکسیدان‌ها در سلول‌های کبدی می‌توان احتمال کاهش آنزیم‌های AST و ALT و ALP را توجیه نمود. با توجه به وجود ترکیبات فلاونوییدی و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی انار انتظار می‌رود که فاکتورهای کبدی کاهش یا بدون تغییر و همچنین پارامترهای کلیوی کاهش یابد (۱۸ و۲).

پارمار و همکاران بیان داشتند که عصاره‌ی پوست انار می‌تواند از آنتریت ناشی از اشعه‌ی یونیزان و آپوپتوز لوکوسیت‌ها در رت‌ها جلوگیری کند (۱۹). کاهش آنزیم‌های کبدی (AST و ALT و ALP) می‌تواند دلالت بر این کند که کبد قادر به سنتز این فاکتورها نیست و یا میزان سنتز آن ها با سرعت کمتری صورت می‌گیرد (۲۰). کاهش آلبومین نیز

ممکن است به دلیل نشت بیشتر پروتئین و آلبومین در ادرار باشد که یکی از نشانه‌های کلینیکی مهم نفروپاتی دیابتی می‌باشد آلبومین بخش مهمی از پروتئین‌های سرم (۳۰ تا ۵۰) درصد راتشکیل می‌دهد که حامل اسیدهای آمینه و بیشترین فعالیت اسمزی در پلاسما (حدود ۷۵ درصد) می‌باشد (۲۰). احتمالا این ترکیبات پلی‌فنلی جهت انتقال در خون سبب افزایش میزان آلبومین سرم می‌شوند. از طرف دیگر با توجه به اینکه سنتز آلبومین در کبد صورت می‌گیرد و افزایش میزان آن نشان دهنده‌ی بهبود در فعالیت کبدی است؛ افزایش پروتئین تام و آلبومین سرم از شاخص‌های اصلی درمان کبد و بازیابی سلامت این ارگان مهم بدن می‌باشد (۲۲ و ۲۱).

جاسمن و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که با تجویز عصاره‌ی پوست انار در گروه‌های مبتلا به فیبروز کبدی ناشی از بستن مجرای صفراوی به‌طور تجربی (ایجاد کولستاز) آنزیم‌های کبدی پس از درمان با این عصاره به‌طور قابل ملاحظه ای کاهش می‌یابد و درمان با عصاره به علت دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و نیز خواص ضد فیبروتیک می‌تواند از ارزش درمانی بالقوه‌ای برخوردار باشد. این گیاه می‌تواند کبد را در برابر فیبروز و آسیب‌های اکسیداتیو به دنبال عفونت‌های ویروسی (باخاصیت ضد ویروس) و سرطان‌های مربوطه تا حد زیادی محافظت نماید (۲۲).

با توجه به اینکه حضور فلاونوئیدها و آلکالوئیدها در گیاهان این خانواده به اثبات رسیده و این ترکیبات کاتابولیسم پروتئین را در سایر بافت ها افزایش می دهد و همچنین دارای خواص ضد التهابی می‌باشند موجب افزایش میزان کراتینین خون می‌شوند، اما همان طور که در این پژوهش مشاهده شد، این تغییرات چندان محسوس نبوده است که این امر احتمالا به‌دلیل خواص مدری قوی این عصاره می‌باشد، زیرا میزان کراتینین سرم در ارتباط با فیلتراسیون بالا است و به دنبال آن میزان دفع کراتینین نیز بالا می‌رود. هرچند که افزایش سطح کراتینین و BUN ضرورتا منعکس کننده‌ی آسیب GFR (Glomerular Filtration Rate) به‌عنوان مارکر غیر مستقیم کلیوی نمی‌باشد، بلکه ممکن است به‌طور ثانویه بیانگر دهیدراتاسیون، هایپرولمی و کاتابولیسم پروتئین باشد (۲۳).

از طرف دیگر برای بررسی فعالیت دقیق کلیه علاوه بر اندازه‌گیری میزان کراتینین سرم می‌بایست میزان کراتینین ادرار، BUN و تاثیرات هیستوپاتولوژی عصاره‌های مختلف این گیاه نیز اندازه‌گیری شود. جهت اظهار نظر پیرامون سمیت کبدی، بررسی آنزیم‌های AST و ALT بیانگر این موضوع بود که عصاره‌ی پوست انار با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری در مقدار ALT و نه AST ایجاد کرد. از آنجایی که افزایش این آنزیم ها بیانگر آسیب کبدی است می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌ی پوست انار با دوزهای مذکور می‌تواند اثرات سمی روی پارانشیم و سلول‌های کبدی داشته باشد. کبد بزرگترین اندام بدن است و دارای هزاران عملکرد بیوشیمیایی نظیر: پردازش مواد غذایی، دفع سموم و تولید اسیدهای صفرایی است، نقش محوری در تغذیه و متابولیسم ویتامین‌ها دارد. ساخت پروتئین‌های حیاتی مثل آلبومین، فاکتورهای انعقادی و آپو پروتئین‌ها در کبد صورت می‌گیرد (۲٤و ۲۳و ٤). پارمار و کار (۲۰۰۸) اثر عصاره‌ی پوست میوه انار بر روی پراکسیداسیون لیپیدی بافت‌ها و مقادیر سرمی هورمون‌های تیروئیدی، انسولین و سایر عوامل موثر بر گلوکز رت‌های نر را بررسی کردند. عصاره، پراکسیداسیون لیپیدی را در کبد، قلب، کلیه کاهش داده و نیز مقدار گلوکز سرم را پایین می‌آورد (۲٦و۲۵)

اسماعیلی و همکاران بیان کردندکه کارکرد بیوشیمیایی کبد توسط آنزیم‌ها ارزیابی می‌شود و تغییر در میزان این آنزیم‌ها جهت ارزیابی عملکرد کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله آنزیم‌های کبدی: آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) بوده که حضور این آنزیم ها را در خون نشانه‌ی افزایش نفوذپذیری یا نکروز شدن و یا

تخریب سلول‌های کبدی می‌دانند (۲۸و۲۷ و۱۵). به نظر می‌رسد در موش‌های تیمار شده با عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار به صورت وابسته به دوز با اثرات آنتی‌اکسیدانی خود و عملکرد ترکیبات فنلی موجود باعث افزایش سطح سرمی آنزیم‌ها و آسیب جدی به بافت کبدی شود (۳۰ و ۲۹).

نتیجه گیری

یافته‌ی تحقیق تجویز عصاره‌ی هیدروالکلی پوست انار نشان می‌دهد هر چند این عصاره باعث از بین بردن کاندیدیازیس دهانی (برفک یا تراش) می‌گردد و عوامل پاتوژن قارچی و باکتریایی را نابود می کند و نیز در بهبود و ترمیم بافت مخاطی موثر است، اما بر الگوی پارامترهای بیوشیمیایی سرم تاثیر گذار بوده که نشان از ایجاد اختلال در عملکرد اندام‌های حیاتی بدن نظیر: کبد، کلیه می‌باشد و سایر قسمت‌های بدن را تحت شعاع خود قرار می‌دهد. این عصاره را می‌توان به صورت دهان شویه در افراد مبتلا به دیابت و یا نقص ایمنی در جهت بر طرف نمودن ضایعات مختلف عفونی دهانی مورد استفاده قرارداد و از مصرف خوراکی و سیستمیک آن باید خودداری نمود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از کلیه‌ی همکاران آزمایشگاه میکروب‌شناسی، بیوشیمی بالینی و اساتید محترم که در انجام این تحقیق مرا یاری و راهنمایی نمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1- Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12th ed. New York: Saunders; 2010.

2- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989; 43: 186-89.

3- Ghoneim K. Distured acetylcholinesterase activity in haemolymph and fat bodies of *schistocerca gregaria (forskal)(orthoptera: acrididae) by extracts* of pomegranate punica *granatum linn.* and *toothpick weed ammi visnaga* l. 2015.

4- Bastaki A. Diabetes mellitus and its treatment. *Int J Diabetes Metab*. 2005; 13: 111.

5- Cassarett Douls. Toxicology: The basic science of poison. 6th ed. Newyork: McGraw- Hill; 2001.

6- Mada Z, Abel R, Samish S, Arad J. Glucose lowering effect of fenugreek non- insulin dependent. *Eur J Clin Nutr*. 1988; 42: 51-54.

7- Chia C, Chena W, Chic T, et al. Phosphatidylinositol -3- kinase is involved in the antihypergly cemic effect induced by resveratril in streptozotocin induced rats. *Life Sci.* 2007; 80: 1713-20.

8- El-Sayed BM, Hakim Y, El-Sayed HM, Ali HA. Effect of partial replacement of yellow corn by pomegranate peel with or without allzyme ssf on growth performance and health status of *Oreochromis Niloticus World.* 2014; 6: 182-9.

9- Kume E, Fujimura H, Matsuki N, Ito M, Aruga C, Toriumi W. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin- induced diabetes in mice. *Exp Toxic Pathol.* 2004; 55: 467-80.

10- Mirzaee A, Hakimi MH, Sadeghi H. Total antioxidant activity and phenolic content of Dorema aucheri: *Iran J Biocheme Mol Biol*. 2005; 1: 11.

11- Motamedi F, Nematbakhsh M, Monajemi R, et al. Effect of pomegranate flower extract on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Nephropathology*. 2014; 3: 133.

12- Abd-Elmageed M, Hussein B. Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Salvia officinalis L.* flowers. *Sudan J Med Sci.* 2008; 3: 127-32.

13- Moneim AEA, Dkhil MA, Al-Quraishy S. Studies on the effect of pomegranate *(Punica granatum)* juice and peel on liver and kidney in adult male rats. *J Med Plants Res.* 2011; 5: 5083-8.

14- Najafzadeh H, Aghel N, Hemmati A, Oulapour S. Effect of hydro alcoholic extract of peel of *Punica granatum* on experimental diabetes mellitus by streptozotocin in rats. *Pharmace Sci*. 2011; 16: 239-48.

15- Abdollahzadeh S. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. J Dentistry (Tehran, Iran), 2011. 8: 1.

16- Coruh N, Sagdicoglu Celep AG, Ozgokce F. Antioxidant properties of *Prangos ferulacea L. Lindl, Chaerophyllum macropodum Boiss. and Heracleum persicum Desf.* from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. *Food chem.* 2007; 100: 1237-42.

17- Bakkiyaraj D, Nandhini JR, Malathy B, Pandian SK. The anti-biofilm potential of pomegranate *(Punica granatum L.)* extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling.* 2013; 29: 929-37.

18- Jadidoleslame M, SHahraki M, Abbasnejad M. The survey of Aleo vera aqueous extra and glibenclamid interaction on blood glucose, LFT and lipids diabetic induced male rats by streptozotocin. *Rafsanjan Med Univ J.* 2011; 3:185-94. [Article in Persian]

19- Parmar HS, Kar A. Medicinal values of fruit peels from *Citrus sinensis, Punica granatum,* and *Musa paradisiaca* with respect to alterations in tissue lipid peroxidation and serum concentration of glucose, insulin, and thyroid hormones. J Med Food. 2008; 2: 376-81.

20- Maraldi T, Vauzour D, Angeloni C. Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology 2013. 2014; 2014. officinalis L. flowers. Sudan JMS. 2008; 3(2 :(127-33.

21- Eidi M. Antidiabetic effect of *Punica granatum L.* hydro-ethanolic extract in streptozotocin-induced diabetic rats. 2014: 81-7.

22- Jasmine R, Daisy P. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of eugenia jambolana in streptozotocin-diabetic rats. *Asian J Biochem.* 2007; 2: 269-73.

23- Black JG. Microbiology Principlesand Explorations. 2012; 8th: 189-90.

24- Almdal JP, Vilstrup H. Strict insulin therapy normalize organ nitrogen contents capacity of urea nitrogen synthesis in experimental diabetes in rats. *Diabetlogia.* 1988; 31: 114-118.

25- Parmar HS, Kar A. Antidiabetic potential of *Citrus sinensis* and *Punica granatum* peel extracts in alloxan treated male mice. *Biofactors.* 2007; 31: 17-24.

26- Aliyazicioglu R, Tosun G, Eyupoglu E. Characterısatıon of volatıle compounds by spme and gc-fid/ms of capers *(Capparis spinosa L.)*. *African J of Agri Res.* 2015;10: 2213-7.

27- Asgary S, Sahebkar A, Afshani MR, Keshvari M, Haghjooyjavanmard S, Rafieian-Kopaei M. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endotheloal function improving, hypolipidemic and anti-Inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. *Phytother Res.* 2014; 28: 193-9.

28- Esmaeili MA, Sombol A, Kanani M, Sadeghi H, Karimian Pour N. Evaluation of the effect of *Salvia Sahandica* on tissue damages induced by alcohol in oxidative stress conditions in the rat: effect on liver and kidney oxidative parameters. *Pharmalogic Sci.* 2008; 15: 315-22.

29- Gilbert RE, Connelly K, Kelly DJ, Pollock CA, Krum H. Heart failure and nephropathy: catastrophic and interrelated complications of diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006; 1: 193-208.

30- Mazandarani M, Khojamli Z, Bayat H, Daneshvar A. The investigation of secondary metabolites content of *Punica granatum L.* in two natural regions of Golestan province, North of Iran. J plant Res. 2010; 5: 63-70.

The Effect of Hydro-Peel (Pomegranate Peel) on Blood Biochemical Parameters in Diabetic Rats Infected with *Candida Albicans*

Sadeghpour M[1], Noorbakhsh F[2]

[1]Dept. of Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch of Tehran, Tehran, Iran.

[2]Dept. of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University, Varamin Branch, Varamin, Iran.

Corresponding Author: Sadeghpour M, Dept. of Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology, Islamic Azad University , Science and Research Branch of Tehran, Tehran, Iran.

E-mail: majid_sadeghpoor@yahoo.com

Received: 6 Apr 2015 **Accepted:** 8 Aug 2015

***Background and Objective*:** Pomegranate peel contains many compounds of glycosides, flavonoids and anthocyanins. Candida albicans is the commonest cause for oral fungal infections in individuals with immune system deficiency and people with diabetes. This study was an endeavor to illustrate the effects of pomegranate peel on some blood parameters including creatinine, urea, total protein, albumin, and liver enzymes AST, ALT and ALP in rats infected with Candida albicans.

***Materials and Methods*:** In this experimental study 30 male Wistar rats were allocated to six groups of five. In the control group, the diabetic rats were contaminated by an infectious dose of fungus Candida albicans. Then, the rats were treated with dissolved extract of itraconazole in drinking water. The remaining four groups received pomegranate peel extract dissolved in drinking water at doses of 25, 50, 100 and 200 mg/kg according to their body weight for 7 days 24 hours. The effectiveness of pomegranate peel extract was compared with itraconazole. Their weight was measured on days zero and seven.

Results: The results showed a significant increase in the plasma concentration of albumin and total protein levels than the control group ($p<0.01$). Liver enzymes decreased in a dose dependent manner according to the concentration changes ($p<0.001$).

Conclusion: The administration of pomegranate peel extract showed significant improvement in oral Candidiasis lesions and repair of mucosal tissue. However, the presence of flavonoids and alkaloids in Punicaceae plants has negative effect on biomedical parameters and lead to disorders in functioning of vital organs.

Keywords: Pomegranate peel, Rats, Candida albicans, Liver enzymes