

## اثر فلاوونوئید روتین بر میزان گلوکز خون و آنزیم های تنظیم کننده آن در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*)

احمد ایمانی<sup>۱\*</sup>، مهرداد فرهنگی<sup>۱</sup>، غلامرضا رفیعی<sup>۱</sup>، راضیه یزدانپرست<sup>۲</sup>، ایزابل وزکز بانانته<sup>۴</sup>

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳. مؤسسه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

۴. گروه بیوشیمی و زیست شناسی ملکولی، دانشکده داروسازی، دانشگاه بارسلونا

### چکیده

امروزه استفاده از پروتئین های گیاهی در جیره غذایی آبزیان و افزایش بهره وری از آن ها از اهمیت خاصی برخوردار است. با این وجود این منابع سرشار از ترکیبات کربوهیدراتی هستند. در این مطالعه اثر تزریق غلظت و انواع مختلف فلاوونوئید روتین در تنظیم میزان قند خون ماهی سیم دریایی در سه آزمایش مختلف مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان با جیره غذایی حاوی ۲۵ درصد نشاسته ژلاتینه شده تغذیه گردیدند. تزریق ۱۰۰ mg/kg BW از هر دو شکل فلاوونوئید روتین (محلول و نامحلول در آب) سبب کاهش معنی دار قند خون ( $209/39 \pm 34/44$  و  $120/18 \pm 9/84$  mg/dl به ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین نامحلول در آب،  $125/5 \pm 6/54$  و  $99/83 \pm 6/46$  به ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین محلول در آب) و همچنین افزایش معنی دار میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز ( $6/13 \pm 1/20$  و  $1/77 \pm 0/22$  U/g protein) به ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین نامحلول در آب،  $20/19 \pm 1/51$  و  $25/77 \pm 1/61$  به ترتیب برای گروه شاهد و تیمار شده با روتین محلول در آب) گردید. با این وجود، مدت زمان لازم برای اثر گذاری روتین نامحلول در آب، کوتاه تر از نوع محلول در آب بود (۶ و ۹ ساعت، به ترتیب). می توان چنین نتیجه گیری نمود که فلاوونوئید روتین توانایی مداخله در متابولیسم گلوکز را در این آبزی دارا می باشد. همچنین به نظر می رسد که مسیرهای متابولیکی گلوکز حداقل در ماهی سیم دریایی نظیر مدل های دیگر آزمایشگاهی از قابلیت دستکاری، برای تنظیم میزان قند خون، برخوردار است.

**واژگان کلیدی:** فلاوونوئید روتین، هیپرگلیسمی، گلوکوکیناز، سیم دریایی

\*نویسنده مسوول، پست الکترونیک: ahmad\_im2003@yahoo.com

## ۱. مقدمه

صنعت آبی‌پروری با سرعت بیشتری در مقایسه با سایر بخش‌های تولید منابع غذایی حیوانی در حال رشد است. به علاوه اقبال جهانی بر متراکم‌سازی هر چه بیشتر پرورش آبزیان به دلیل محدودیت منابع آب و زمین در دسترس جهت توسعه این صنعت متکی به جیره غذایی مصنوعی به منظور تأمین مواد مغذی و انرژی مورد نیاز آبی‌پروری می‌باشد (Gatlin *et al.*, 2007). در این میان، بخش مهمی از نهاده‌های اولیه مصرفی در تولید غذای مورد نیاز مزارع پرورش متراکم آبزیان از منابع دریایی تأمین می‌شود و انتظار می‌رود که تا سال ۲۰۱۵ سهم آبی‌پروری در استفاده از این تولیدات به ۷۰ درصد بالغ گردد. با این وجود علی‌رغم افزایش تقاضای جهانی برای مصرف پودر ماهی، تولید جهانی این ماده غذایی ثابت باقی مانده است (Panserat, 2009). چنین روندی باعث قوت گرفتن انجام مطالعات بیشتر در زمینه یافتن منابع جایگزین گیاهی و فرمولاسیون بهینه جیره غذایی آبزیان شده است (Panserat *et al.*, 2009). پروتئین‌های گیاهی با آن که به نظر می‌رسد در آینده نقش مهمی در فرمولاسیون‌های غذایی آبزیان ایفا نمایند، اما حاوی مقادیر زیادی ترکیبات کربوهیدراتی هستند. با این وجود استفاده از کربوهیدرات‌ها در ماهیان پرورشی از کارایی کمتری نسبت به جانوران خشکی‌زی برخوردار است (Hemre *et al.*, 2002). این نکته مبین این حقیقت است که مطالعات فیزیولوژی تغذیه آبزیان بایستی در پی شناخت بهتر مسیرهای متابولیسم مواد مغذی (به ویژه گلوکز) در آبزیان و نیز بررسی امکان تنظیم این مسیر از طریق دستکاری تغذیه‌ای آن باشد. تمام آنزیم‌های مورد نیاز برای انجام فرآیند گلیکولیز و متابولیسم گلوکز در ماهیان گزارش شده‌اند (Enes *et al.*, 2009).

ماهیان از مکانیسم مشابهی نظیر پستانداران در تنظیم قند خون استفاده می‌کنند (Polakof *et al.*, 2007). بررسی اثر کربوهیدرات‌ها بر ترشح انسولین

در ماهیان نشان داده است که ماهیان نظیر انسان از حالتی شبیه دیابت نوع II رنج می‌برند (Wright *et al.*, 2000)، که می‌تواند به دلیل تعداد محدودتر گیرنده‌های انسولین در عضلات ماهیان، ظرفیت محدود فسفریلاسیون گلوکز، تعداد اندک ناقلین گلوکز و سرانجام عدم توانایی ماهیان در تنظیم تعادل میان جذب کبد و تولید گلوکز در کبد باشد (Panserat *et al.*, 2001; Polakof *et al.*, 2008; Enes *et al.*, 2009).

داروهای متعددی جهت اصلاح هومئوستازی گلوکز در انسان استفاده می‌شوند. این داروها با تحریک ترشح انسولین و بهبود عملکرد آن، تأخیر در گوارش و جذب پلی‌ساکاریدها و یا کاهش تولید گلوکز در کبد عمل می‌کنند (Al-Hasani *et al.*, 2003). مکانیسم‌های احتمالی مقاومت به انسولین در کبد باعث تغییراتی در نسبت فعالیت آنزیم‌های G6Pase/Glucokinase (GK) و افزایش مقدار G6P سلول‌های کبدی می‌گردند (Minassian *et al.*, 1998). با ایمپلنت متفورمین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، mRNA آنزیم گلوکوکیناز کبدی افزایش و G6Pase و PFK1 کاهش یافت (Polakof *et al.*, 2009). مصرف متفورمین سه روز قبل از نمونه‌برداری در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که قادر به کنترل سطح گلوکز پلاسما است (Panserat *et al.*, 2009). امروزه گیاهان منابع مهمی از داروها محسوب می‌شوند. مکانیسم تأثیر برخی از گیاهان در کنترل متابولیسم گلوکز را می‌توان به فعال یا غیرفعال کردن آنزیم‌های کلیدی گلیکولیز و چرخه کربس نسبت داد (Prabhakar and Doble, 2008). عصاره آبی و پلی‌ساکاریدهای *Livioespicata* از طریق افزایش فعالیت آنزیم گلوکوکیناز و کاهش فعالیت آنزیم G6Pase موجب بهبود عملکرد انسولین و افزایش ذخیره گلیکوژن در کبد شدند (Bai *et al.*, 2009). پلی‌فنول‌ها از طریق ممانعت از گوارش و جذب قندها در روده، تنظیم آزاد شدن گلوکز از کبد و بهبود جذب آن در بافت‌های حساس به انسولین

احتمالی متابولیسم گلوکز که از قابلیت دستکاری به منظور ارتقاء توانایی آبزبان بویژه ماهیان پرورشی گوشتخوار برخوردار باشند، ممکن است در تهیه جیره‌های غذایی با کیفیت، مؤثر واقع گردد. تهیه جیره‌های غذایی با کیفیت مناسب که از یک سو موجب افزایش رشد و بهبود کارایی حیوان گردد و از سوی دیگر موجب به حداقل رسیدن تلفات مواد مغذی شود، از اهمیت زیادی در توسعه پایدار پرورش آبزبان برخوردار است (Oliva-Teles, 2000). در این مطالعه اثر استفاده از فلاونوئید روتین بر میزان قند خون و مسیر متابولیسمی گلوکز و همچنین غلظت مؤثر این ترکیب جهت فراهم آوردن اطلاعات پایه برای دستکاری مسیرهای متابولیسمی گلوکز در کبد و افزایش قابلیت این گونه و سایر آبزبان گوشتخوار در استفاده از منابع غذایی حاوی کربوهیدرات‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲. مواد و روش‌ها

سیستم پرورشی و شرایط نگهداری بچه ماهیان جوان سیم دریایی (*Sparus aurata*) از مزرعه پرورش تجاری این ماهی در کشور اسپانیا تهیه و به دانشگاه بارسلونا منتقل گردیدند. ۳۰ قطعه ماهی در هر مخزن ۲۵۰ لیتری با جریان مداوم آب به صورت یک سازگان بسته پرورش آبزبان در اتاق عایق حرارتی، توزیع شدند. پیراسنجه‌های کیفی آب به طور مرتب هر هفته سنجیده شد (جدول ۱). میزان تعویض آب حدود ۳۰ درصد در هفته بود. ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی دو مرتبه در روز و در حد ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند. این مطالعه به مدت ۳ هفته و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. آزمایشات دو هفته بعد از تطبیق پذیری ماهیان به سیستم پرورشی آغاز گردیدند.

عمل می نمایند (Hanhineva et al., 2010). اسید کروزلولیک باعث بهبود عملکرد انسولین و جذب گلوکز توسط سلول‌های عضلانی می‌شود (Lee and Thuong, 2010). مریم نخودی *Teucrium polium* از گیاهان متعلق به خانواده Lamiaceae در طب سنتی ایرانی کاربرد فراوانی به منظور کاهش قند خون دارد. جزء به جزء سازی عصاره متانولی این گیاه حاکی از وجود چند ترکیب فلاونوئیدی به نام‌های Rutin (۰/۳۳٪)، Apigenin (۰/۲۴٪)، 3',6 dimethoxyapigenin (۰/۱۴٪) و 4',6 dimethoxyapigenin (۰/۱۲٪) است (Sharififar et al., 2009). خواص ضد دیابتی عصاره متانولی گیاه *T. polium* ناشی از اثر حفاظتی فلاونوئیدهای آن در برابر استرس اکسیداتیو و سرانجام افزایش ترشح انسولین توسط سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس می‌باشد (Esmailiet al., 2009). استفاده از ترکیبات ثانویه گیاهی به عنوان افزودنی‌های غذایی در صنعت آبی پروری به تازگی مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیبات از مشتقات گیاهی به شمار می‌روند که به منظور افزایش خوشخوراکی و یا کارایی رشد و تغذیه‌ای آبی به جیره غذایی اضافه می‌شوند. ترکیبات گیاهی مذکور (مانند ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی) اثرات متعددی در موجود هدف نظیر بهبود کارایی تغذیه‌ای و گوارش و کاهش ترشح نیتروژن بر جای می‌گذارند (Encarnaçao, 2008). در این میان فلاونوئیدها طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی را شامل می‌شوند که از اهمیت بسزایی در علوم دارویی به عنوان مواد آنتی‌اکسیدانی، ترکیبات بازدارنده رشد تومورهای سرطانی و ... برخوردار می‌باشند (Hanhinova et al., 2010). با توجه به اهمیت کربوهیدرات‌ها به عنوان منابع ارزان قیمت تأمین انرژی و همچنین فراوانی حضور آن‌ها در منابع غذایی گیاهی، شناسایی مسیرهای

جدول ۱. فاکتورهای کیفی آب در دوره پرورش ماهیان

پیراستجه	درجه حرارت	اکسیژن	شوری	آمونیاک	pH
مقدار	۱۸±۰/۴°C	۷±۰/۲ ppm	۳۸±۰/۵ ppt	۰/۰۲±۰/۰۱ ppm	۷/۸±۰/۴

### آزمایش دوم

وزن ماهیان مورد استفاده در این آزمایش ۱/۴۴±۰/۵۵ گرم بود. در پایان هفته دوم تغذیه با جیره غذایی آزمایشی، در روز آزمایش ماهیان یک ساعت بعد از تغذیه با استفاده از MS-222 بیهوش و روتین محلول در آب بر اساس نتایج حاصل از آزمایش اول در غلظت‌های ۰ (CD)، ۵۰ (R50D)، ۱۰۰ (R100D) و ۲۰۰ mg/kg BW (R200D) به صورت درون صفاقی تزریق گردید. بدین منظور روتین در سرم فیزیولوژیکی حل شد. نمونه های خون و کبد به ترتیب ۰، ۶ و ۹ ساعت بعد از تزریق تهیه گردید (حداقل ۷ ماهی از هر تیمار). بقیه مراحل نظیر آزمایش اول صورت پذیرفت.

### آزمایش سوم

وزن ماهیان مورد استفاده در این آزمایش ۱/۹۰±۰/۲۴ گرم بود. در پایان هفته دوم تغذیه با جیره غذایی آزمایشی، در روز آزمایش ماهیان یک ساعت بعد از تغذیه با استفاده از MS-222 بیهوش و روتین محلول در آب با توجه به نتایج آزمایش های اول و دوم در غلظت های ۰ (CD) و ۱۰۰ mg/kg BW (R100D) به صورت درون صفاقی تزریق گردید. روتین در سرم فیزیولوژیکی حل شد. نمونه های خون و کبد به ترتیب ۰، ۳، ۶، ۹ و ۲۴ ساعت بعد از تزریق از تیمارهای مختلف (حداقل ۷ ماهی از هر تیمار) تهیه گردید. بقیه مراحل نظیر آزمایش اول صورت پذیرفت. میزان گلوکز نمونه های خون با استفاده از کیت تجاری (Spain, Spinreact) تعیین شد. عصاره خام مورد نیاز جهت انجام سنجش های آنزیمی از طریق همگن نمودن کبد منجمد پودر شده (۱:۵ w:v) در محلول ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با pH=۷/۵، ۴ میلی مولار EDTA، ۵۰ میلی مولار

جیره غذایی مورد استفاده به ترتیب دارای ۲۵، ۴۴/۶ و ۱۴/۵ درصد کربوهیدرات، پروتئین و چربی بود. سطح کربوهیدرات در جیره های غذایی بالاتر از حد بهینه (۱۵ درصد) برای رشد مطلوب ماهی سیم دریایی تنظیم شد (Koven, 2002).

در این مطالعه سطح مؤثر فلاوونوئید روتین و همچنین مدت زمان لازم برای اثرگذاری آن طی سه آزمایش تعیین گردید. از آنجائیکه سنجش آنزیم های متابولیکی گلوکز در کبد از هزینه زیادی برخوردار است، به خاطر حصول اطمینان از این که با تزریق روتین میزان آنزیم گلوکوکیناز در کبد افزایش می یابد (نتایج آزمایش اول)، در آزمایش دوم آنزیم های کبدی سنجیده نشدند.

### آزمایش اول

وزن ماهیان مورد استفاده در این آزمایش ۳۲/۵۳±۲/۱۰ گرم بود. در پایان هفته دوم تغذیه با جیره غذایی آزمایشی، در روز آزمایش ماهیان یک ساعت بعد از تغذیه با غلظت ۷۰ mg/l از MS-222 بیهوش و روتین نامحلول در آب در غلظت های ۰ (CD)، ۵۰ (R50D)، ۱۰۰ (R100D) و ۵۰۰ mg/kg BW (R500D) به صورت درون صفاقی تزریق شد (Hanhinova et al., 2010). روتین در محلول نمکی Tween یک درصد امولسیون گردید (Torres-Piedra et al., 2010). نمونه های خون و کبد به ترتیب ۰، ۳ و ۶ ساعت بعد از تزریق تهیه شد (حداقل ۷ ماهی از هر تیمار) (Peres et al., 1999). نمونه های خون بلافاصله در ۴ درجه سانتیگراد و ۶۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیدند. تمام نمونه های پلاسما حاصل تا زمان انجام سنجش ها در ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Figueiredo-Silva et al., 2010).

از آزمون‌های Kolmogorov Smirnov به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه برای مقایسه واریانس تیمارها و از آزمون توکی برای بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها استفاده گردید. در مواقع لازم از آزمون t-استیودنت نیز استفاده به عمل آمد. در آزمون‌های آماری سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در نرم‌افزار SPSS 15 تلقی شد. نتایج به صورت  $\text{Mean} \pm \text{SE}$  گزارش شدند.

### ۳. نتایج

#### آزمایش اول

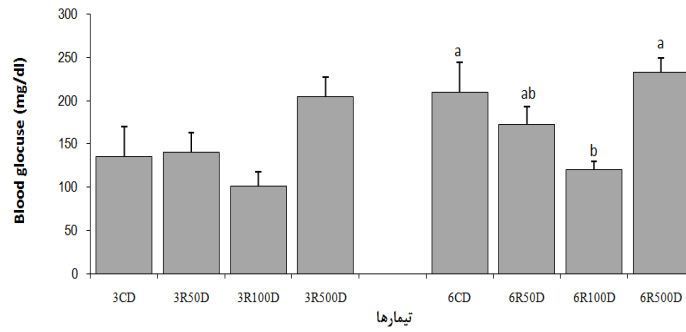
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، ۳ ساعت بعد از تزریق روتین، هیچ اختلاف معنی‌داری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده نشد. اما با گذشت ۶ ساعت از تزریق این ترکیب، اختلاف معنی‌داری از نظر میزان گلوکز خون میان 6CD، 6R100D و 6R500D مشاهده گردید، به نحوی که دریافت ۱۰۰ BW mg/kg روتین سبب کاهش معنی‌دار مقدار گلوکز خون گردید ( $P < 0/05$ ). میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها (گلوکز) در جدول ۲ ارائه شده است. در میان آنزیم‌های مورد مطالعه تنها میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز (GK) ۶ ساعت بعد از تزریق روتین، با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان داد ( $P < 0/05$ ).

۱۰۰ میلی مولار NaF، ۰/۵ میلی مولار PMSF، ۱ میلی مولار (Phenylmethylsulfonyl fluoride)، ۲۵۰ میلی مولار DTT (Dithiothreitol) و ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و ۲۰۰۰۰ g تهیه شد (Metonet *et al.*, 1999). مقدار پروتئین محلول عصاره‌ها به روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976).

فعالیت آنزیم گلوکوکیناز به کمک تغییرات در میزان جذب نوری در ۳۴۰ nm در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از آنزیم Glucose-6-(G6PDase) و phosphate dehydrogenase به عنوان آنزیم کمکی در حضور NADP تعیین گردید (Caseras *et al.*, 2000).

سنجش فعالیت آنزیم PFK1 از طریق ثبت تغییرات در میزان جذب نوری در طول موج ۳۴۰ nm در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از آنزیم‌های کمکی Fructose bisphosphatealdolase، Glycerol-3-phosphate و phosphateisomerase در حضور NADP انجام شد (Meton *et al.*, 2003). میزان فعالیت FBPase1 در حضور آنزیم‌های کمکی Phosphate-glucose isomerase و G6P-DH و در طول موج ۳۴۰ nm نظیر دیگر آنزیم‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد تعیین گردید (Meton *et al.*, 1999).

میزان فعالیت آنزیم PK به کمک تغییرات در میزان جذب نوری در ۳۴۰ nm در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و با استفاده از آنزیم کمکی Lactate dehydrogenase در حضور NADP تعیین گردید (Meton *et al.*, 2003).



شکل ۱. میزان قند خود در زمان های مختلف نمونه برداری بعد از تزریق غلظت های مختلف روتین نامحلول در آب. حروف مختلف روی ستون ها نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۲. میزان فعالیت آنزیم های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات ها پس از تزریق غلظت های مختلف روتین بر حسب U/g protein (Mean±SE)

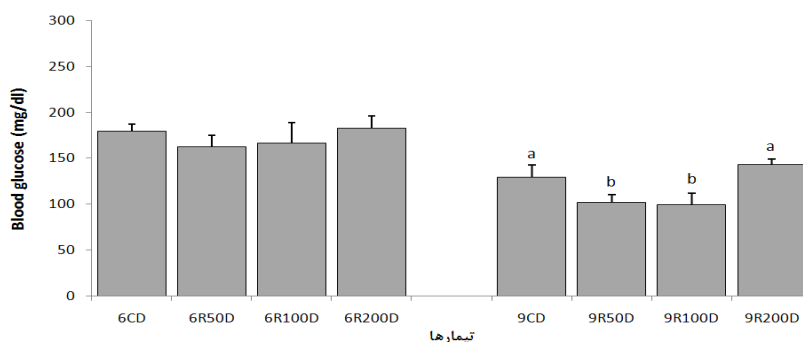
ساعت آنزیم	3CD	3R50D	3R100D	3R500D	6CD	6R50D	6R100D	6R500D
GK	0.50±0.30	0.72±0.38	0.34±0.11	0.58±0.28	1.77±0.22*	3.81±0.60 <sup>ab</sup>	6.13±1.20 <sup>a</sup>	3.02±0.25 <sup>b</sup>
PFK1	33/55±0/40	31/93±1/29	29/17±0/80	32/89±0/71	32/23±0/40	30/67±1/14	31/00±0/82	30/44±0/79
FBPase1	79/81±5/86	76/57±10/94	62/75±1/83	77/21±7/13	61/14±2/76	59/38±3/28	54/73±1/48	61/94±3/87
PK	291/9±17/66	282/3±10/49	288/8±11/09	220/0±16/97	311/5±15/23	324/4±11/08	316/4±10/64	314/4±18/98

\* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می باشد ( $P < 0.05$ ).

## آزمایش دوم

از تزریق این ترکیب، اختلاف معنی داری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای های آزمایشی مشاهده گردید، به نحوی که دریافت ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg روتین سبب کاهش معنی دار مقدار گلوکز خون در مقایسه با سایر تیمارها گردید ( $P < 0.05$ ).

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، ۶ ساعت بعد از تزریق روتین محلول در آب، اختلاف معنی داری از نظر میزان گلوکز خون میان تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده نشد. اما با گذشت ۹ ساعت

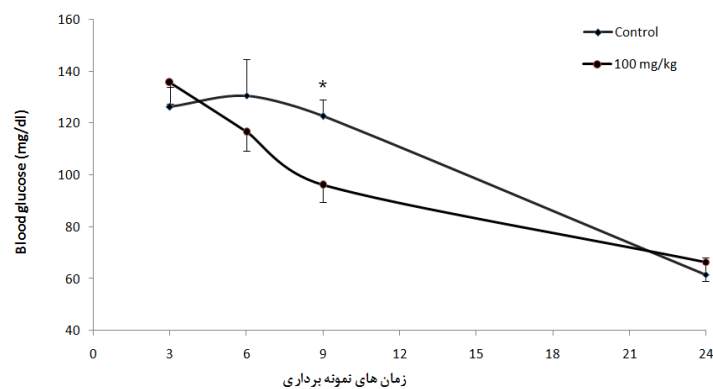


شکل ۲. میزان قند خود در زمان‌های مختلف نمونه برداری بعد از تزریق غلظت‌های مختلف روتین محلول در آب. حروف مختلف روی ستون‌ها نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

گردید. با این حال در ساعات بعدی نمونه برداری اختلافی از این نظر بین تیمارها مشاهده نشد. میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها (بجز GK) در جدول ۳ ارائه شده است. در میان آنزیم‌های مورد مطالعه تنها میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز (GK) ۹ ساعت بعد از تزریق روتین (شکل ۴)، اختلاف معنی داری با تیمار شاهد نشان داد ( $P < 0.05$ ).

### آزمایش سوم

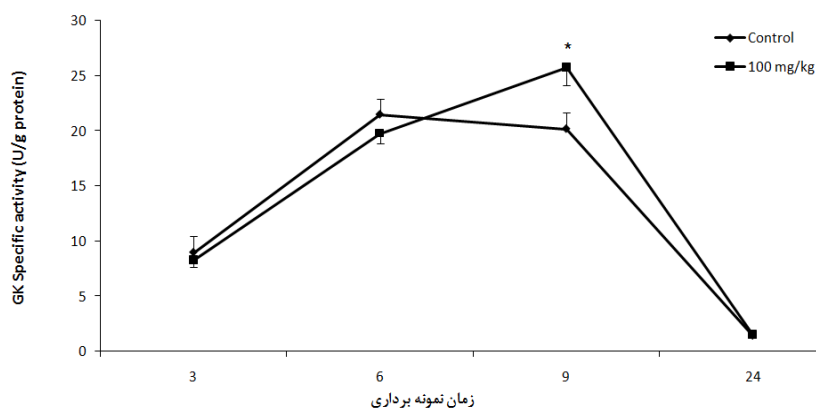
همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، ۳ و ۶ ساعت بعد از تزریق روتین، اختلاف معنی دار آماری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد. اما با گذشت ۹ ساعت از تزریق این ترکیب، اختلاف معنی داری از نظر میزان گلوکز خون بین تیمارهای مختلف مشاهده گردید، به نحوی که دریافت ۱۰۰ mg/kg BW روتین سبب کاهش معنی دار مقدار گلوکز خون در مقایسه با تیمار شاهد



شکل ۳. میزان قند خون در زمان‌های مختلف نمونه برداری بعد از تزریق ۱۰۰ mg/kg BW روتین محلول در آب. علامت \* روی نمودار نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳. میزان فعالیت آنزیم‌های کبدی دخیل در متابولیسم کربوهیدرات‌ها پس از تزریق غلظت‌های مختلف روتین به U/g protein (Mean±SE)

ساعت	24R100D	24CD	9R100D	9CD	آنزیم
	۳۹/۴۶±۴/۳۸	۳۷/۱۹±۱/۴۶	۳۹/۶۱±۳/۰۵	۳۶/۴۸±۱/۲۶	PFK1
	۷۲/۱۴±۱/۵۶	۷۹/۱۸±۵/۷۶	۶۹/۰۵±۴/۸۵	۷۱/۸۳±۲/۳۹	FBPase1
	۲۹۸/۸±۲۹/۶۹	۳۴۲/۴±۱۷/۹۹	۳۷۴/۳±۱۴/۹۶	۳۷۳/۱±۱۹/۰۸	PK



شکل ۴. میزان فعالیت آنزیم GK بعد از تزریق ۱۰۰ mg/kg روتین محلول در آب. علامت \* روی نمودار نشانه وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در زمان نمونه برداری معین می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

#### ۴. بحث و نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش اول، می‌توان نتیجه گرفت که دوز ۱۰۰ mg/kg از کارایی بیشتری در مقایسه با سایر سطوح مورد استفاده در این مطالعه در کاهش میزان گلوکز خون برخوردار است. این نتایج با سایر مطالعات موجود در این زمینه در موش‌های دیابتی شده منطبق می‌باشد؛ طی آزمایشی در موش‌های دیابتی، تجویز روزانه روتین به مدت ۴۵ روز سبب کاهش معنی دار میزان گلوکز خون گردید و در میان دوزهای مورد استفاده (۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) دوز بالاتر از اثر بخشی بیشتری برخوردار بود (Kamalakkannan and Prince, 2006; Kamalakkannan and Alnumair,

2009). در مطالعه دیگری روی موش‌های دیابتی تزریق ۵۰ mg/kg روتین سبب کاهش میزان گلوکز خون گردید (Henrique-Fernandez *et al.*, 2010). تجویز عصاره آبی گل بابونه (BW/day) و ۵۰۰ mg/kg، (mg/kg) ۵۰ BW/day) esculetin و ۵۰ mg/kg quercetin (۵۰ mg/kg BW/day) به موش‌های دیابتی (مدت ۲۱ روز) باعث کاهش قند خون در مقایسه با موش‌های دیابتی بدون تیمار شد (Kato *et al.*, 2008). در موش‌های دیابتی دوز ۵۰ mg/kg از apigenin-6-C-β-1-fucopyranoside موجب کاهش میزان گلوکز خون در مقایسه با گروه بدون درمان گردید (Cazarloi *et al.*, 2009).



افراد همچنین در مقایسه با موش‌های معمولی دارای ۵۰ درصد افزایش در فعالیت آنزیمی بودند و سطح گلوکز پلاسمای آنها ۲۵ درصد کاهش نشان داد. حذف ژن آنزیم گلوکوکیناز به صورت موضعی و تنها در کبد، سبب بروزحالتی شبیه مقاومت انسولینی در موش‌ها شد (Iynedjian, 2009). از مهمترین داروهای مورد استفاده برای اصلاح هموستازی گلوکز می‌توان به متفورمین اشاره کرد که از طریق بهبود پاسخ کبد به انسولین اثر خود را در کاهش قند خون بروز می‌دهد. در مطالعه انجام شده روی موش‌های دیابتی، نسبت فعالیت آنزیمی G6Pase/GK دو برابر افزایش یافت. با این که خوراندن متفورمین اثری در کاهش این نسبت نداشت، اما سبب بازگرداندن اثر انسولین در کاهش غلظت G6P سلول‌های کبدی شد (Minassian et al., 1998). ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با ایمپلنت متفورمین از میزان گلوکز خون بالایی بعد از تزریق گلوکز برخوردار بودند. در کبد این گروه از ماهیان mRNA آنزیم گلوکوکیناز افزایش و G6Pase و PFK1 کاهش یافت. محققین عدم اثر متفورمین بر میزان قند خون را در مقایسه با ایمپلنت انسولین، به گرسنگی شش روزه ماهیان نسبت دادند. زیرا در این شرایط تمامی مکانیسم‌های درونی جهت جلوگیری از افت قند خون آغاز می‌شود (Polakof et al., 2009). بررسی دیگری در ارتباط با گنجاندن متفورمین سه روز قبل از نمونه‌برداری برای تعیین قند خون در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که متفورمین قادر به کنترل سطح گلوکز پلاسمای می‌باشد. همچنین میزان بالای کربوهیدرات در جیره موجب افزایش بیان ژن آنزیم‌های گلوکوکیناز و آنزیم‌های لیپوژنیک (G6PDH) glucose-6P dehydrogenase، Fatty acid synthase گردید. البته وجود متفورمین در جیره غذایی موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن آنزیم G6PDH گردید (Panserat et al., 2009). با گنجاندن ۰/۲ g/kg از فلاونوئید naringin یا hesperidin در جیره غذایی موش‌های با دیابت نوع

نتایج مربوط به میزان گلوکز خون در آزمایش‌های دوم و سوم با استفاده از روتین محلول در آب نشان داد که غلظت ۱۰۰ mg/kg BW از کارایی بیشتری در مقایسه با سایر سطوح مورد استفاده برخوردار است. با این تفاوت که کاهش معنی‌دار مقدار قند خون برای شکل محلول در چربی در ۶ ساعت و برای نوع محلول در آب ۹ ساعت بعد از تزریق بود. تأثیر سریع روتین نامحلول در آب ممکن است به دلیل جذب سریع آن از پرده صفاق و هیپاتوسیت‌ها و در نتیجه مداخله سریعتر آن در مسیرهای پیام‌رسانی درون سلولی باشد که در بخش فعالیت‌های آنزیمی به آن اشاره خواهد شد. متیلاسیون فلاونوئیدها باعث بهبود جذب آن‌ها از غشاهای زیستی و افزایش زیست‌فرآهمی آن‌ها می‌شود (Walle, 2009). جذب اشکال چربی دوست quercetin و اشکال بدون قند آن سریع‌تر از مشتقات آبدوست با گروه‌های آسیل و سولفات می‌باشد (Spencer et al., 2004; Materska, 2008). خاطر نشان می‌شود که شکل آبدوست فلاونوئید مورد استفاده در آزمایش دوم و سوم به صورت نمک سولفاتی بود (Merck fact sheet, Germany).

نتایج سنجش فعالیت‌های آنزیمی نشان داد که تزریق هر دو شکل فلاونوئید روتین با دوز مؤثر ۱۰۰ mg/kg سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گلوکوکیناز کبد شد. افزایش فعالیت GK مشابه روند کاهش میزان گلیسیمی خون ماهیان مورد مطالعه بود، به نحوی که در آزمایش اول با استفاده از روتین محلول در چربی بیشینه فعالیت آنزیمی ۶ ساعت بعد از تزریق تعیین شد. میزان بیشینه فعالیت GK در آزمایش سوم ۹ ساعت بعد از تزریق ثبت گردید. کوچکترین تغییر در میزان فعالیت آنزیم گلوکوکیناز سبب تغییر سرعت فسفریلاسیون گلوکز در درون سلول‌های بتا و کبدی می‌شود (Postic et al., 2001). اثر تغییر در میزان فعالیت گلوکوکیناز کبد در هموستازی گلوکز کل (بدن)، در موش‌های با یک نسخه اضافی از ژن این آنزیم بررسی شده است. این

## منابع

- Al-hasani, H., Tschop, M.H., Cushman, S.W. 2003. Two Birds with One Stone. *Mol. Interv.* 3: 367-374.
- Bai, X., Chen, X., Liu, Y., Tian, L., Zhou, Q., Liu, S., Fang, J., Chen, J. 2009. Effects of water extract and crude polysaccharides from *Liriopespicatavar. prolifera* on InsR/IRS-1/PI3K pathway and glucose metabolism in mice. *J. Ethnopharmacol.* 125: 482-486.
- Bhagavan, N.V. 2002. Carbohydrate metabolism II: Gluconeogenesis, glycogen synthesis and breakdown and alternative pathways. In: *Medical biochemistry, Fourth Edition.* Harcourt/Academic Press, Massachusetts, USA, pp 275-305.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Caseras, A., Meton, I., Fernandez, F., Baanante, I.V. 2000. Glucokinase gene expression is nutritionally regulated in the liver of gilthead seabream (*Sparusaurata*). *Biochim. Biophys. Acta* 1493: 135-141.
- Cazarolli, L.H., Folador, P., Moresco, H.H., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G., Silva, F.R. M.B. 2009. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2''-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)- $\beta$ -l-fucopyranoside on  $^{14}$ C-glucose uptake. *Chem. Biol. Interact.* 179: 407-412.
- Encarnaçãõ, P. 2008. The Potential of Phytochemicals in Aquaculture. In: Steiner, T. (Edt.). *Phytochemicals in Animal Nutrition Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance.* Nottingham University Press, UK, pp 147-156.
- Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A. 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in Fish. *Fish Physiol. Biochem.* 3: 519-539.
- Esmaili, M.A., Zohari, F., Sadeghi, H. 2009. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucriumpolium* on cell destruction in a model of streptozotocin induces diabetes. *Plant Med.* 75: 1418-1420.
- Figueiredo-Silva, A.C., Corraze, G., Kaushik, S., Peleterio, J.B., Valente, L.M. 2010. Modulation of Black spot sea bream (*Pagellusbogaraveo*) intermediary metabolic pathway by dispensable amino acids. *Amino Acids* 39: 1401-1416.

II (به مدت ۵ هفته) مشاهده شد که فلاوونوئیدها سبب افزایش میزان بیان ژن رمز کننده GK در کبد این موش‌ها شد (Jung *et al.*, 2004). به نظر می‌رسد فلاوونوئیدها دارای مکانیسم عملکردی دوگانه تنظیم کننده ترشح انسولین و شبه انسولینی می‌باشند (Cazarolli *et al.*, 2009).

تزریق اشکال مختلف فلاوونوئید روتین در این مطالعه برای اولین بار نشان داد که مشابه مدل‌های پستانداران، قادر به کاهش میزان گلوکز خون از طریق فعالسازی مسیر فسفریلاسیون آن در کبد هستند. از سوی دیگر این یافته نشان می‌دهد که مسیرهای پیام‌رسانی و متابولیسم گلوکز دست کم در ماهی سیم دریایی مشابه پستانداران می‌باشد. این تشابه می‌تواند نوید بخش استفاده از روش‌های اصلاح مسیرهای متابولیسمی مورد استفاده در انسان برای افزایش کارایی آبریان گوشتخوار در استفاده از منابع غذایی حاوی مقادیر بالای کربوهیدرات از یک سو و استفاده از آبریان به عنوان مدل‌های آزمایشگاهی جهت انجام مطالعه در مورد دیابت از سوی دیگر باشد. با این حال، برای شناخت بهتر مکانیسم عملکرد فلاوونوئیدها در آبریان، نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه زیست‌فراهمی، مکانیسم جذب سلولی، متابولیسم و فعالیت زیستی متابولیت‌های حاصل و غلظت‌های مؤثر اضافه‌شونده به جیره غذایی و مقایسه اثرات حاصل با نتایج به دست آمده از تزریق این ترکیبات است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های مالی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری جمهوری اسلامی ایران به خاطر فراهم آوردن شرایط اقامت در کشور اسپانیا و همچنین حمایت‌های مالی دانشگاه بارسلونا جهت انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

- Materska, M. 2008. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 58: 407-413.
- Meton, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Canto, E., Fernandez, F., Baanante, I.V. 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Brit. J. Nutr.* 82: 223-232.
- Meton, I., Fernandez, F., Baanante, I.V. 2003. Short and long term effects of refeeding on key enzyme activities in glycolysis-gluconeogenesis in the liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 225: 99-107.
- Meton, I., Caseras, A., Fernandez, F., Baanante, I.V. 2004. Molecular cloning of glucose-6-phosphate catalytic subunit from gilthead sea bream (*Sparus aurata*): response of its mRNA levels and glucokinase expression to refeeding and diet composition. *Comp. Biochem. Physiol. B* 138: 145-153.
- Minassian, C., Tarpin, S., Mithieux, G. 1998. Role of Glucose-6 Phosphatase, Glucokinase and Glucose-6 phosphate in liver insulin resistance and its correction by metformin. *Biochem. Pharmacol.* 55: 1213-1219.
- Oliva-Teles, A. 2000. Recent advances in European sea bass and gilthead sea bream nutrition. *Aquaculture Int.* 8: 477-492.
- Panserat, S., Perrin, A., Kaushik, S. 2001. High dietary lipids induce liver glucose-6-phosphatase expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Nut.* 132: 137-141.
- Panserat, S. 2009. Molecular regulation of intermediary metabolism focusing on utilization of dietary carbohydrate. In: Overturf, K. (Ed.). *Molecular Research in Aquaculture*. Wiley-Blackwell, pp 261-278.
- Panseart, S., Skiba-Cassy, S., Seiliez, I., Lansard, M., Planges-Juan, E., Vachot, C., Aguirre, P., Larroquet, L., Chaverance, G., Medale, F., Corraze, G., Kaushik, S., Moon, T.M. 2009. Metformin improves postprandial glucose homeostasis in rainbow trout fed dietary carbohydrates: a link with the induction of hepatic lipogenic capacities? *Am. J. Physiol. Reg.* 297: R707-R715.
- Peres, H., Gonçalves, P., Oliva-Teles, A. 1999. Glucose tolerance in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass Gatlin III, D.M., Barrows, F.T., Brown, Dabrowski, P.K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, Hu, E.G., Krogdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E. 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38: 551-579.
- Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., Poutanen, K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 1365-1402.
- Hemre, G-I., Mommsen, T.P., Krogdahl, A. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nut.* 8: 175-194.
- Henrique Fernandez, A.A., Barbosa Novelli, E.L., Okoshi, K., Politi, Okoshi, M., Di Muzio, B.P., Campos Guimaraes, J.F., Fernandes Junior, A. 2010. Influence of rutin treatment on biochemical alterations in experimental diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 64: 214-219.
- Iynedjian, P.B. 2009. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cel. Mol. Life Sci.* 66: 27.42.
- Jung, U.J., Lee, M.K., Jeong, K.S., Choi, M.S. 2004. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J. Nutr.* 134: 2499-2503.
- Kamalakkannan, N., Alnumair, K.S. 2009. Rutin alters fatty acid composition in diabetic tissues. *Int. Nutr. Food Sci.* 39: 655-662.
- Kamalakkannan, N., Prince, P.S.M. 2006. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Basic Clin. Pharmacol.* 98: 97-103.
- Kato, A., Minoshima, Y., Yamamoto, J., Adachi, I., Watson, A.A., Nash, R.J. 2008. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *J. Agr. Food Chem.* 56: 8206-8211.
- Kohlmeier, M. 2006. *Nutrient Metabolism*. Academic Press, 829p.
- Koven, W. 2002. Gilthead sea bream, *Sparus aurata*. In: Webster, C.D., Lim, C. (Eds.). *Nutrient requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture*. CABI Publishing, New York, pp 64-78.
- Lee, M.S., Thuong, T.T. 2010. Stimulation of Glucose Uptake by Triterpenoids from *Weigela subsessilis*. *Phytother. Res.* 24: 49-53.

- Spencer, J.P.E., El-Mohsen, M.M.A., Rice-Evans, C. 2004. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. Arch. Biochem. Biophys. 423: 148-161.
- Torres-Piedra, M., Ortiz-Andrade, R., Villalobos-Molina, R., Singh, N., Medina-Franco, J.L., Webster, S.P., Binnie, M., Navarrete-Vázquez, G., Estrada-Soto, S. 2010. A comparative study of flavonoid analogues on streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats: Quercetin as a potential antidiabetic agent acting via 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition. Eur. J. Med. Chem. 45: 2606-2612
- Van Der Vusse, G.J., Reneman, R.S. 1995. Substrate utilization in mammalian cells. In: Bittar, E., Bittar, N. (Eds.). Cell Chemistry and Physiology Part I. Jai Press Inc., Hampton Hill, England, pp 45-75.
- Walle, T. 2009. Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability and chemopreventive effects. Int. J. Mol. Sci. 10: 5002-5019.
- Wright, J.R.J.R., Bonen, A., Conlon, M., Pohajdak, B. 2000. Glucose homeostasis in the teleost fish tilapia: insights from brockmann body xenotransplantation studies. Integr. Comp. Biol. 40: 234-245.
- (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture 179: 415-423.
- Polakof, S., Miguez, J.M., Moon, T.W., Soengas, J.L. 2007. Evidence for the presence of a glucosensor in hypothalamus, hindbrain, and Brockmann bodies of rainbow trout. Am. J. Physiol. Reg. 292: R1657-R1666.
- Polakof, S., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Soengas, J.L. 2008. Altered dietary carbohydrates significantly affect gene expression of the major glucosensing components in Brockmann bodies and hypothalamus of rainbow trout. Am. J. Physiol. Reg. 295: R1077-R1088.
- Polakof, S., Skiba-Cassy, S., Panserat, S. 2009. Glucose homeostasis is impaired by paradoxical interaction between metformin and insulin in carnivorous rainbow trout. Am. J. Physiol. Reg. I. 297: R1769-R17769.
- Postic, C., Shiota, M., Magnuson, M.A. 2001. Cell-specific roles of glucokinase in glucose homeostasis. Rec. Prog. Hormone Res. 56: 195-217.
- Prabhakar, K.B., Doble, M. 2008. A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. Curr. Diabetes Rev. 4: 291-308.
- Sharififar, F., Dehghan-Nudeh, G.h., Mirtajaldini, M. 2009. Major flavonoids from with antioxidant activity from *Teucriumpolium*. Food Chem. 112: 885-888.