

## بررسی اثر موسیلاژ گیاه بامیه بر میزان گلوکز و چربی‌های سرم و بازسازی سلول‌های بتای موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزتوسین

زهرا کرم پور قبچاق<sup>۱\*</sup>، سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۲</sup>، فرح فرخی<sup>۱</sup>

### چکیده

**مقدمه:** با توجه به پیشرفت روزافزون دیابت و استفاده از داروهای جایگزین و کم‌خطر گیاهی، در این مطالعه اثر موسیلاژ استخراج شده از غلاف میوه بامیه بر میزان گلوکز و چربی‌های سرم و بازسازی سلول‌های بتای پانکراس در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزتوسین بررسی شد.

**روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی ۲۴ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار استفاده شد. رت‌ها به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی شامل: شاهد نرمال، شاهد دیابتی و دو گروه دیابتی تیمار شده (خوراکی) با دوزهای ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از موسیلاژ گیاه بامیه قرار گرفتند. پس از تهیه و تأیید گونه گیاه بامیه، استخراج موسیلاژ از غلاف سبز رنگ میوه توسط دستگاه تبخیر در خلأ انجام شد. سه گروه شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار در آغاز دوره با تزریق درون صفاقی ۶۰ mg/kg استرپتوزتوسین دیابتی شدند. پس از طی دوره‌ی تیمار (۴ هفته)، با استفاده از خونگیری از قلب، سطوح سرمی گلوکز، LDL، HDL، کلسترول تام و تری‌گلیسرید در گروه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. همچنین، هیستوپاتولوژی جزایر لانگرهانس در چهار گروه با استفاده از روش رنگ‌آمیزی H&E مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA و Tukey تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) میزان گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و کاهش معنی‌دار HDL در موش‌های دیابتی نسبت به گروه شاهد نرمال بود. مصرف موسیلاژ میوه‌ی بامیه سبب کاهش معنی‌دار گلوکز، تری‌گلیسرید، کلسترول، LDL و افزایش معنی‌دار HDL ( $P < 0/05$ ) در موش‌های دیابتی به صورت وابسته به دوز شد.

**نتیجه‌گیری:** براساس نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد موسیلاژ گیاه بامیه می‌تواند در پیشگیری از عوارض هیپرلیپیدمیک و هیپرگلیسمیک ناشی از دیابت شیرین مؤثر باشد.

**واژگان کلیدی:** دیابت، استرپتوزتوسین، موسیلاژ گیاه بامیه، گلوکز، پروفایل لیپیدی

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

\***نشانی:** ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده‌ی علوم، گروه زیست‌شناسی، کد پستی: ۵۹۷۷۱۵۳۵۷۹. تلفن: ۰۹۳۳۲۱۳۹۸۸۴  
پست الکترونیک: zkarampoor@yahoo.com

## مقدمه

دیابت اختلالی متابولیکی است که به دلیل عدم جذب سلولی قند خون ناشی از کاهش ترشح انسولین و یا مقاومت سلول‌های بدن در برابر انسولین ایجاد می‌شود [۱، ۲]. این بیماری آندوکروینی با اختلالات متابولیکی، عوارض دراز مدت در چشم‌ها، کلیه‌ها، اعصاب و عروق خونی مشخص شده است و با اختلال وسیع در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها، آب و الکترولیت‌ها همراه است [۳]. با توجه به ضایعات متعدد و در برخی موارد کشنده‌ای که بیماری دیابت در افراد مبتلا بر جای می‌گذارد، لزوم بررسی راه‌های درمان، تخفیف و پیشگیری از آن بیشتر احساس می‌شود. هر چند در حال حاضر درمان اصلی و مؤثر برای دیابت قندی استفاده از انسولین و عوامل هیپوگلیسمیک است، ولی این ترکیبات دارای عوارض نامطلوب متعدد نظیر افزایش ذخایر چربی، تحلیل رفتن بافت چربی در محل تزریق و بروز شوک هیپوگلیسمی بوده و در دراز مدت بر روندهای ایجاد عوارض ناتوان کننده دیابت تأثیر ندارند، بنابراین توجه محققین به سوی استفاده از داروهای گیاهی جهت افزودن به برنامه‌ی درمانی بیماران دیابتی جلب گردیده است [۴].

اخیراً گزارش‌هایی در مورد برخی گیاهان دارویی جهت درمان دیابت و فواید آن در جهان پزشکی مطرح شده و به‌طور تجربی به‌عنوان درمانگرهای آنتی‌دیابتی و آنتی‌هیپرلیپیدمی شناسایی شده‌اند [۵، ۶]. کشور ما ایران با توجه به دارا بودن مناطق مختلف آب و هوایی و به‌دنبال آن فلور متنوع گیاهی و دانش بومی غنی در زمینه‌ی طب سنتی، گنجینه با ارزشی جهت مطالعه گیاهان بر مبنای خواص دارویی آنها می‌باشد.

گیاه بامیه با نام علمی *Abelmoschus esculentus* متعلق به خانواده‌ی *Malvaceae* یکی از گیاهان مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که پراکندگی این گیاه در خاورمیانه (ایران) گزارش شده است [۷-۹]. پوست سبز رنگ گیاه بامیه در آسیا به‌عنوان سبزی در طب سنتی به‌کار می‌رود [۸]. این گیاه سرشار از کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، چربی‌ها، آنزیم‌ها، ترکیبات فلاونوئیدی، اسیداولئیک، اسیدلینولئیک، اسید پالمیتیک و مقادیر زیادی موسیلاژ می‌باشد که ترکیب موسیلاژ خود حاوی فیبرهایی نظیر پکتین و کربوکسی متیل سلولز است. به‌دلیل وجود این مواد، گیاه بامیه دارای ارزش دارویی بالایی بوده و برای کنترل بیماری‌های مختلف به‌کار می‌رود [۸، ۱۰]. از جمله این

آثار دارویی می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ممانعت از اکسیداسیون LDL، ضد سرطان، ضد دیابت، ضد آلرژی، محافظت کبد، ضدالتهاب و ضد تومور [۱۱]، کمک به درمان و جوان‌سازی پوست [۱۲]، درمان اسهال، زخم معده و روده و نیز درمان عفونت‌های کلیوی و سوزش ادرار [۱۳] اشاره کرد. این مطالعه به‌منظور بررسی اثر هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک و محافظت سلولی تجویز خوراکی موسیلاژ گیاه بامیه در مدل تجربی دیابت قندی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین به‌مدت ۴ هفته در موش‌های صحرایی انجام شد.

## روش‌ها

در این تحقیق مداخله‌ای از ۲۴ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۱۸۰-۱۵۰ گرم که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود، استفاده شد. حیوانات در اتاقی با دمای  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  و تحت شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۶۰-۴۰ درصد نگهداری شدند. موش‌های صحرایی آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. جهت حصول سازش با شرایط محیط جدید، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت یک هفته از استقرار حیوان‌ها انجام شد. کلیه مراحل این تحقیق از نظر کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با معاهده هلسینکی انجام گرفت.

گیاه بامیه با نام علمی *Abelmoschus esculentus* (رقم Clemson Spineless) در تیر ماه ۱۳۹۴ از بازار خریداری و توسط کارشناس هرباریوم تأیید شد. برای تهیه‌ی موسیلاژ موجود در غلاف میوه‌ی بامیه، پس از جمع‌آوری میوه‌ی تازه و شستشو، غلاف سبز رنگ میوه که حاوی موسیلاژ می‌باشد از میوه جدا شده و در آب به‌مدت ۵ تا ۶ ساعت قرار داده شد [۱۴]. سپس بعد از ۳۰ دقیقه جوشاندن غلاف‌ها، به‌مدت یک ساعت اجازه داده شد تا موسیلاژ موجود در آنها به آب آزاد شود. موسیلاژ خارج شده در پارچه نخی چند لایه قرار داده شد تا عصاره آن جدا شود، آنگاه استونی که سه بار فیلتر شده بود به موسیلاژ اضافه گردید موسیلاژ استخراج شده در آن با درجه حرارت ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک و پس از غربال کردن در دسیکاتور با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۴۵ درصد نگه‌داری شد [۱۵، ۱۶].

های آزمایشگاهی منتقل گردید و پس از سانتیفریوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سرم آنها جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای سنجش فاکتورهای مورد نظر نگاه‌داری شد. برای بررسی بافت‌ها نیز، پس از آسان‌کنی رت‌ها، بافت پانکراس جدا شد. بافت‌ها پس از چندین بار شستشو در سالین، به‌منظور تثبیت به ظرف حاوی فرمالین ۱۰٪ انتقال داده شدند. پس از تثبیت نمونه‌ها و تهیه‌ی مقاطع بافتی به ضخامت ۵ میکرون توسط میکروتوم، رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-اِئوزین انجام گرفت و از میکروسکوپ نوری NIKON مدل ECLIPSE E200 برای بررسی تغییرات بافتی بهره گرفته شد.

در نهایت داده‌های به‌دست آمده به‌صورت  $Mean \pm SD$  در نمودارهایی که در برنامه Excel نسخه ۲۰۱۰ اجرا شدند، ارائه گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ تحلیل شدند. تمام نتایج با استفاده از آزمون‌های ANOVA و پس از آزمون Tukey به‌دست آمده و سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم نشان داد که در هفته‌ی قبل از بررسی تفاوت معنی‌داری  $P < 0/05$  بین گروه‌ها یافت نشد. در هفته‌های ۲ و ۴ میزان گلوکز سرم در سه گروه شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موسیلاژ بامیه در حد معنی‌دار بیشتر از گروه شاهد نرمال بود، هر چند که در گروه‌های دیابتی تیمار شده، میزان گلوکز سرم به‌صورت وابسته به دز به‌طور معنی‌دار در هفته‌های ۲ و ۴ کمتر از گروه شاهد دیابتی بود (نمودار ۱) اما بین این گروه‌ها با گروه شاهد نرمال اختلاف هم‌چنان معنی‌دار باقی ماند.

همچنین آنالیز آماری نتایج نشان داد که میانگین سطح سرمی کلسترول توتال، تری‌گلیسرید و LDL در رت‌های گروه شاهد دیابتی در مقایسه با رت‌های گروه شاهد نرمال بیشتر بود ( $P < 0/05$ ). در حالی که این فاکتورها در هر دو گروه دیابتی دریافت‌کننده‌ی موسیلاژ گیاه بامیه نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دز کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) داشت (به‌ترتیب نمودارهای ۲، ۳ و ۴)، مقایسه میانگین‌های غلظت سرمی HDL نیز در

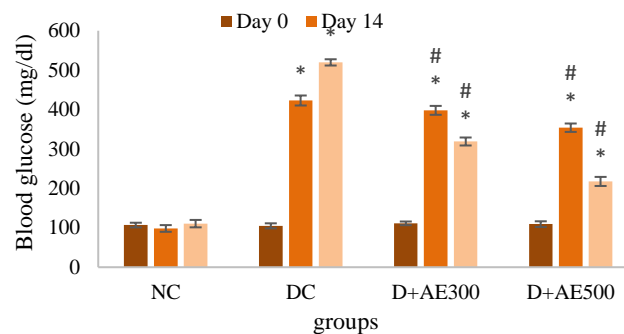
به‌منظور انجام آزمایش، رت‌ها به‌صورت تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. گروه اول (NC)، شاهد نرمال که در طول مطالعه بدون ابتلا به دیابت فقط غذای معمولی و ۱ ml نرمال سالین (گاواژ) دریافت کردند، گروه دوم (DC)، شاهد دیابتی که پس از یک هفته مصرف غذای معمولی، با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین (از شرکت Sigma Aldrich) به میزان  $60 \text{ mg/kg}$  مبتلا به دیابت شدند و در طول آزمایش فقط غذای معمولی و ۱ ml نرمال سالین (گاواژ) دریافت کردند. گروه سوم (D+AE ۳۰۰)، گروه دیابتی تیمار شده با موسیلاژ گیاه بامیه که به‌مدت ۴ هفته موسیلاژ بامیه را به‌میزان  $300 \text{ mg/kg}$  وزن بدن به‌صورت روزانه از طریق گاواژ دریافت کردند، گروه چهارم (D+AE ۵۰۰)، گروه دیابتی تیمار شده با موسیلاژ گیاه بامیه که به‌مدت ۴ هفته موسیلاژ بامیه را به‌میزان  $500 \text{ mg/kg}$  وزن بدن به‌صورت روزانه از طریق گاواژ دریافت کردند، لازم به ذکر است که قبل از تزریق استرپتوزوتوسین به گروه‌های دیابتی، ابتدا استرپتوزوتوسین در محلول ۱۰ میلی‌مولار بافر سدیم سیترات سرد با  $\text{PH} = 4/5$  حل و سپس تزریق گردید [۱۷] و به گروه شاهد نرمال به‌منظور شوک حاصل از تزریق، تنها  $0/5 \text{ ml}$  نرمال سالین تزریق شد. ۷۲ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، دیابتی شدن مشخص گردید. ملاک دیابتی شدن افزایش میزان گلوکز خون بیشتر از  $300 \text{ mg/dl}$  (دستگاه گلوکومتر) بود [۱۸].

قابل ذکر است که در این تحقیق، اندازه‌گیری گلوکز خون حیوانات در چهار نوبت، قبل از شروع مطالعه (هفته‌ی قبل از بررسی یا روز ۰)، بعد از تزریق استرپتوزوتوسین (هفته‌ی اول یا روز ۴)، دو هفته بعد از تیمار رت‌ها با موسیلاژ گیاه بامیه (هفته‌ی دوم یا روز ۱۴) و در پایان دوره آزمایش (هفته‌ی چهارم یا روز ۲۸) صورت گرفت. که سه نوبت اول، دوم و سوم به ترتیب با استفاده از دستگاه گلوکومتر (On Call EZ, SD, USA) و نوبت چهارم با استفاده از کیت مربوطه به روش اسپکتروفتومتری انجام شد. قبل از انجام هر خونگیری، حیوانات به‌مدت ۱۶ ساعت ناشتا نگه داشته شدند. همچنین سطح سرمی کلسترول توتال، تری‌گلیسرید، LDL و HDL توسط کیت‌های مربوطه و به روش فتومتری، در انتهای آزمایش از سرم تهیه شده اندازه‌گیری شد. تهیه سرم به‌روش زیر صورت گرفت، پس از اتمام دوره‌ی آزمایش (۴ هفته)، بلافاصله بعد از باز نمودن قفسه سینه خونگیری از قلب حیوانات انجام شده و به لوله

(شکل B). همچنین در گروه دریافت کننده ۳۰۰mg/kg موسیلاژ بامیه افزایش جزایر لانگرهانس و کاهش سلول‌های التهابی و آتروفی نسبت به گروه شاهد دیابتی مشاهده شد (شکل C) و در گروه دریافت کننده ۵۰۰mg/kg موسیلاژ بامیه نیز افزایش تعداد و اندازه‌ی جزایر سلولی مثل گروه تحت تیمار با ۳۰۰ mg/kg موسیلاژ بود ولی آثار آتروفی و التهاب نسبت به گروه شاهد دیابتی کاهش چشم‌گیرتری داشت (شکل D). در کل با توجه به نتایج بافتی، گروه‌های تحت تیمار با موسیلاژ بامیه به‌صورت وابسته به دز توانسته بودند آثار تخریبی ناشی از دیابت را به‌طور قابل ملاحظه تری کاهش دهند.

حیوانات مورد مطالعه نشان داد که بین گروه شاهد نرمال با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به‌طوریکه سطح HDL در گروه‌های دیابتی در حد معنی‌دار کمتر از گروه شاهد نرمال بود و تیمار رت‌ها با ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موسیلاژ بامیه، موجب افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) سطح HDL نسبت به گروه شاهد دیابتی شد (نمودار ۵).

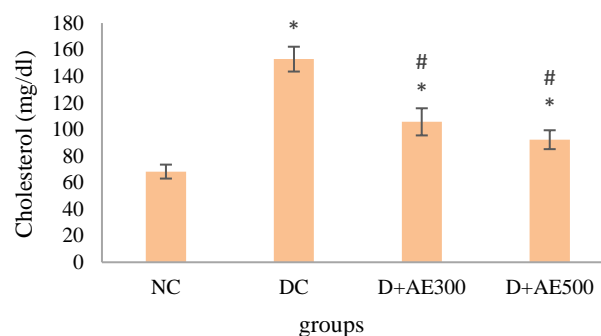
بررسی و مطالعه اسلایدهای بافت پانکراس گروه شاهد نرمال نشان داد که اندازه‌ی جزایر بزرگ، سلول‌ها سالم و منظم هستند و آثار التهاب و آتروفی در سلول‌های جزایر مشاهده نمی‌شود (شکل A). از طرفی در گروه دیابتی از تعداد و اندازه‌ی جزایر کاسته و آثار التهاب و آتروفی و چروکیدگی سلول‌های جزایر قابل مشاهده است



نمودار ۱- بررسی سطح سرمی گلوکز در گروه‌های مختلف (n=6)

NC: گروه شاهد نرمال، DC: گروه شاهد دیابتی، ۳۰۰ D+AE: گروه دیابتی تیمار شده با ۳۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه، ۵۰۰ D+AE: گروه دیابتی تیمار شده با ۵۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه

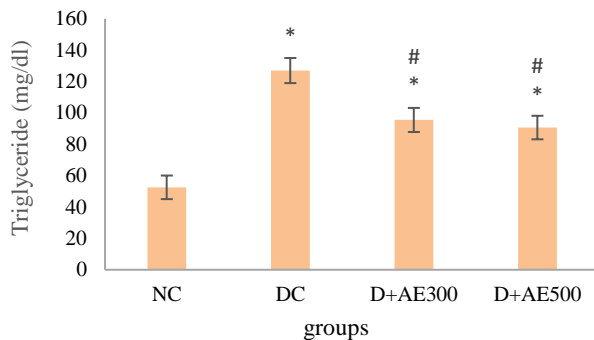
\* $P < 0.05$  نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه NC و # $P < 0.05$  نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه DC



نمودار ۲- بررسی سطح سرمی کلسترول توتال در گروه‌های مختلف (n=6)

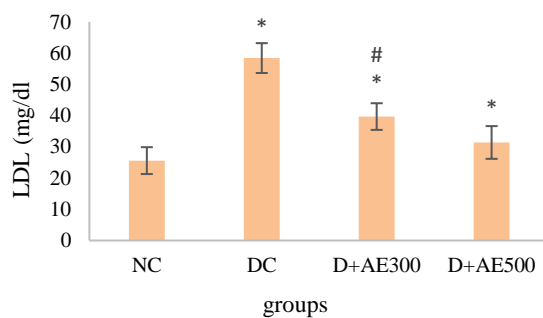
NC: گروه شاهد نرمال، DC: گروه شاهد دیابتی، ۳۰۰ D+AE: گروه دیابتی تیمار شده با ۳۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه، ۵۰۰ D+AE: گروه دیابتی تیمار شده با ۵۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه

\* $P < 0.05$  نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه NC و # $P < 0.05$  نشان دهنده تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه DC



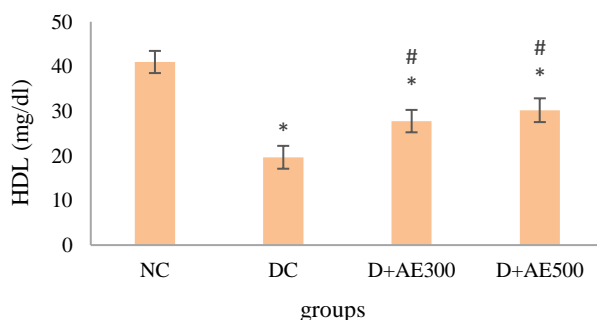
**نمودار ۳: بررسی سطح سرمی تری‌گلیسرید در گروه‌های مختلف (n=۶)**

NC: گروه شاهد نرمال، DC: گروه شاهد دیابتی، D+AE ۳۰۰: گروه دیابتی تیمار شده با ۳۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه، D+AE ۵۰۰: گروه دیابتی تیمار شده با ۵۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه  
 \*  $p < 0/05$  نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه NC و #  $p < 0/05$  نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه DC



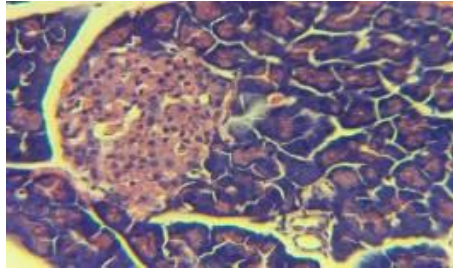
**نمودار ۴- بررسی سطح سرمی LDL در گروه‌های مختلف (n=۶)**

NC: گروه شاهد نرمال، DC: گروه شاهد دیابتی، D+AE ۳۰۰: گروه دیابتی تیمار شده با ۳۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه، D+AE ۵۰۰: گروه دیابتی تیمار شده با ۵۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه  
 \*  $P < 0/05$  نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه NC و #  $P < 0/05$  نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه DC

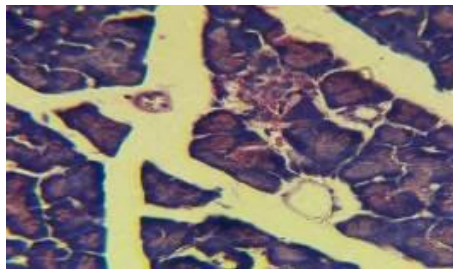


**نمودار ۵- بررسی سطح سرمی HDL در گروه‌های مختلف (n=۶)**

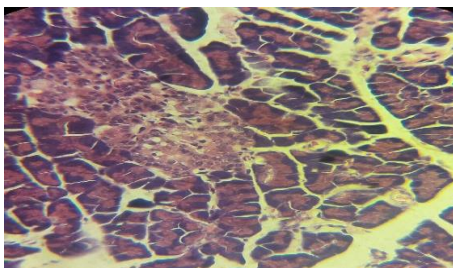
NC: گروه شاهد نرمال، DC: گروه شاهد دیابتی، D+AE ۳۰۰: گروه دیابتی تیمار شده با ۳۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه، D+AE ۵۰۰: گروه دیابتی تیمار شده با ۵۰۰mg/kg موسیلاژ گیاه بامیه  
 \*  $P < 0/05$  نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه NC و #  $P < 0/05$  نشان دهنده تفاوت معنی دار نسبت به گروه DC



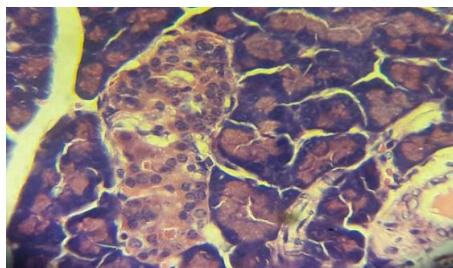
شکل A- در گروه شاهد نرمال (NC)، اندازه و قطر جزایر لانگرهانس در حد طبیعی هستند و هیچ گونه ضایعه‌ای مانند آتروفی و التهاب در جزایر مشاهده نشد، برش عرضی از بافت پانکراس گروه شاهد نرمال. درشت‌نمایی  $\times 400$ ، رنگ آمیزی H&E.



شکل B- در گروه شاهد دیابتی (DC)، قطر جزایر کاسته شده و آثار التهاب و آتروفی و کانون‌های متعدد نکروز سلول‌های جزایر لانگرهانس نیز در این گروه به چشم می‌خورد، برش عرضی از بافت پانکراس گروه شاهد دیابتی. درشت‌نمایی  $\times 400$ ، رنگ آمیزی H&E.



شکل C- در گروه دیابتی تحت تیمار با  $300 \text{ mg/kg}$  موسیلاژ گیاه بامیه ( $D+AE 300$ )، افزایش اندازه و تعداد جزایر لانگرهانس و تا حدودی کاهش آثار التهاب و آتروفی و کانون‌های نکروز در مقایسه با گروه شاهد دیابتی مشاهده شد. برش عرضی از بافت پانکراس گروه دیابتی تحت تیمار با  $300 \text{ mg/kg}$  موسیلاژ. درشت‌نمایی  $\times 400$ ، رنگ آمیزی H&E.



شکل D- در گروه دیابتی تحت تیمار با  $500 \text{ mg/kg}$  موسیلاژ گیاه بامیه ( $D+AE 500$ )، افزایش تعداد و قطر جزایر و کاهش قابل ملاحظه آثار آتروفی و کانون‌های نکروز نسبت به بقیه گروه‌های دیابتی مشاهده شد. برش عرضی از بافت پانکراس گروه دیابتی تحت تیمار با  $500 \text{ mg/kg}$  موسیلاژ. درشت‌نمایی  $\times 400$ ، رنگ آمیزی H&E.

## بحث

نتایج این بررسی نشان داد که تجویز خوراکی موسیلاژ بامیه به مدت ۴ هفته در موش‌های دیابتی، به صورت وابسته به دز تغییر معنی داری در میزان گلوکز سرم ایجاد می‌نماید و دارای اثر هیپوگلیسمیک در حد متوسط و معنی‌دار می‌باشد، احتمالاً این گیاه اثر خود را از طریق بهبود بافت پانکراس، به تبع آن افزایش ترشح انسولین و کاهش سطح سرمی گلوکز انجام می‌دهد. همچنین تیمار رت‌های دیابتی با موسیلاژ این گیاه موجب کاهش معنی‌دار سطح کلسترول توتال، تری‌گلیسرید، کلسترول LDL و افزایش مطلوب و معنی‌دار سطح HDL در مقایسه با گروه شاهد دیابتی شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر با نتایج مطالعه‌ی Sabitha و همکاران در سال ۲۰۱۱ و Baradaran و همکاران در سال ۲۰۱۳، که حاکی از اثر عصاره‌ی اتانولی بامیه در کاهش قند خون و لیپیدهای پلاسمایی موش‌های دیابتی است، همسو می‌باشد [۱۹، ۱۱]. همچنین Woolfe در سال ۱۹۹۷ گزارش نمود که موسیلاژ غلاف گیاه بامیه سبب کاهش پروفایل لیپیدی می‌شود که با نتایج این تحقیق یکسان می‌باشد [۲۰]. براساس یافته‌های قبلی، حالت دیابت قندی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین در موش صحرائی با تغییرات دژنراتیو بارز در جزایر لانگرهانس پانکراس و تغییرات بارز و نامطلوب در سطح لیپیدها و لیپوپروتئین‌های پلازما همراه می‌باشد که در این ارتباط برخی بافت‌های بدن به‌ویژه کبد از نظر جذب اسیدهای چرب آزاد خون، اکسیداسیون و تبدیل متابولیک آنها به سایر مواد، افزایش سنتز کلسترول و فسفولیپیدها و ترشح برخی انواع لیپوپروتئین‌ها به داخل خون نقش مهمی به انجام می‌رسانند [۲۲، ۲۱]. همچنین افزایش سطح کلسترول و تری‌گلیسرید سرم در موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین قبلاً نیز گزارش شده است که این نتایج تا حدودی در بررسی حاضر نیز به‌دست آمد. از طرف دیگر، در موش‌های صحرائی دیابتی شده توسط آلوکسان یا استرپتوزوتوسین، افزایش سطح گلوکز خون می‌تواند به‌طور غیرمستقیم موجب افزایش سطح کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و کاهش سطح HDL شود [۲۴، ۲۳]، که این خود تا حدودی توجیه‌کننده‌ی تغییرات نامطلوب سطح چربی‌های سرم در موش‌های دیابتی شده در این تحقیق می‌باشد.

تحقیقات نشان می‌دهند استرپتوزوتوسین به‌عنوان ماده دیابت‌زا، با وارد نمودن آسیب به غشاء سلول‌های بتا پانکراس، موجب تخریب این سلول‌ها که وظیفه بیوسنتز و ترشح انسولین را دارند شده و لذا از این طریق موجب افزایش گلوکز خون می‌شود. استرپتوزوتوسین از طریق انتقال دهنده گلوکز GLUT2 (Glucose Transporter 2) وارد سلول بتای پانکراس می‌گردد و باعث آلکلیه شدن DNA می‌شود. تخریب DNA باعث فعال شدن پلی ADP ریبوزیلاسیون شده که این مرحله برای دیابت‌زایی استرپتوزوتوسین مهم‌تر از تخریب خود DNA می‌باشد. پلی ADP ریبوزیلاسیون باعث تهی شدن سلول از  $NAD^+$  و ATP می‌شود. افزایش فسفریلاسیون ATP پس از درمان با استرپتوزوتوسین، سوبسترای را برای گزانتین اکسیداز فراهم آورده که منجر به تشکیل رادیکال‌های سوپر اکساید می‌شود. به تبع آن، رادیکال‌های هیدروکسیل و هیدروژن پراکساید نیز تولید می‌شوند. به علاوه، استرپتوزوتوسین، مقادیر سمی نیتریک اکساید را که فعالیت سم‌زدایی را مهار کرده و در تخریب DNA شرکت می‌کنند را آزاد می‌سازد. در نتیجه عملکرد استرپتوزوتوسین، سلول‌های بتای پانکراس دچار نکروز می‌شوند، با نکروز سلول‌های بتا، ترشح انسولین کاهش یافته و در نتیجه سطح گلوکز خون افزایش می‌یابد [۲۷-۲۵].

در خصوص اثرات سودمند مصرف خوراکی موسیلاژ گیاه بامیه مشخص شده است که این گیاه دارای خاصیت پاداکسندگی و محافظت سلول در برابر آسیب‌های شیمیایی شامل سموم محیطی، کاهش دادن پراکسیداسیون لیپیدی در نواحی بافتی مختلف و محافظت بافت‌هایی نظیر پانکراس و کبد در برابر انواع استرس‌های شیمیایی می‌باشد که علت اصلی آن وجود سطح بالا از مواد پاداکسند نظیر فلاونوئیدهای کوئرستین و کتچین می‌باشد [۱۲]. این فلاونوئیدها با داشتن خاصیت پاداکسندگی مانع از تخریب سلول‌های بتا به‌واسطه عوامل اکسیداتیو و در نتیجه قادر به ترمیم سلول‌های بتای آسیب دیده و افزایش ترشح انسولین از این سلول‌ها خواهند بود [۳۳-۲۸]. Vessal و همکاران در سال ۲۰۰۳ در تحقیقات خود نشان داده‌اند که کوئرستین بازسازی سلول‌های بتای پانکراس را افزایش داده و موجب افزایش آزاد سازی انسولین در رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین و در نتیجه کاهش غلظت گلوکز خون می‌شود [۳۴]. کوئرستین هم چنین با میانجی‌گری

AMPK (AMP-activated protein kinase) باعث تسهیل در جایگیری GLUT4 (Glucose Transporter 4) و در نتیجه افزایش جذب گلوکز در عضلات می‌شود. کوثرستین قادر به فعال کردن AMPK بوده و از این طریق بیان mRNA ی GLUT4 و جایگیری پروتئین را افزایش داده، و موجب بهبود حساسیت به انسولین در کبد و عضلات می‌شود [۳۷-۳۵].

از طرف دیگر کوثرستین با مهار آلفا-گلوکوزیداز در روده، مانع از جذب گلوکز و ورود آن به خون می‌شود [۳۸، ۳۹]. بخشی از اثرات سودمند و هیپوگلیسمیک این فلاونوئید را شاید بتوان به افزایش دادن فعالیت هگزوکیناز و گلوکوکیناز کبدی و محافظت و حتی افزایش دادن تراکم سلول‌های بتا در جزایر لانگرهانس به‌علت اثر پاداکسندگی آن نسبت داد [۴۰]. بنابراین، مقایسه‌ی نمودار سطح گلوکز اشاره بر این دارد که توانایی بامیه در کاهش دادن سطح گلوکز افزایش یافته، تنها نمی‌تواند به واسطه افزایش سطح انسولین و به حد نرمال رسیدن این هورمون [۳۲] باشد، بلکه تاثیر فلاونوئیدهایی مانند کوثرستین موجود در بامیه بر فعالیت AMPK و اثر مهاری آن بر آلفا-گلوکوزیداز و نیز تاثیر فیبر موجود در گیاه بامیه در تأخیر ورود غذا از معده به روده و کاهش جذب فاکتورهای غذایی و به تبع آن جذب کمتر گلوکز [۴۱] می‌تواند به‌صورت غیر وابسته به انسولین باعث کاهش سطح گلوکز خون شود.

با توجه به اینکه در مطالعه‌ی حاضر تغییرات مطلوبی در بهبود و بازسازی بافت پانکراس و کاهش التهاب جزایر لانگرهانس در گروه های دیابتی تحت تیمار در مقایسه با گروه شاهد دیابتی مشاهده شد، می‌توان گفت که اثرات سودمند گیاه بامیه احتمالاً از طریق محافظت بافت پانکراس در برابر ترکیبات اکسیدانتهی به انجام رسیده است. زیرا ترکیبات فلاونوئیدی موجود در این گیاه به‌عنوان ماده‌ی پاداکسندگی و دارای خاصیت شبه انسولینی از تخریب بافت پانکراس و آسیب سلول‌های بتا جلوگیری کرده و از این طریق قادر به کاهش دادن علائم دیابت قندی و کنترل سطح لیپیدهای سرم شدند [۲۹]. همچنین موسیلاژ موجود در میوه‌ی گیاه بامیه سبب مهار جذب کلسترول مضر و کاهش لیپید سرم و بافت می‌شود و در سلول‌های جدا شده از کبد موش مشاهده شده که این موسیلاژ سبب کاهش سنتز و ترشح ApoB و VLDL می‌شود [۴۲]. پکتین موجود در این میوه باعث افزایش در دفع اسیدهای صفراوی شده و در نتیجه سبب

افزایش سنتز اسیدهای صفراوی از کلسترول، کاهش کلسترول و کاهش ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود [۴۳]. از سوی دیگر فیبر موجود در بامیه، کاهش پارامترهای لیپیدی را در پی دارد و میزان کلسترول-LDL پلاسما را از طریق جلوگیری از جذب اسیدهای صفراوی و کلسترول و افزایش فعالیت رسپتور LDL کاهش می‌دهد. همچنین رژیم غنی از فیبر میزان تری‌گلیسیرید را با مهار لیپوژنز در کبد کاهش می‌دهد [۴۵، ۴۴]. مطالعه‌ی Bomzon و همکاران در سال ۲۰۰۵ که بر روی اثر هیپولیپیدمیک چندین گیاه حاوی موسیلاژ در مدل حیوانی انجام شد نشان داد که موسیلاژ باعث کاهش پروفایل لیپیدی می‌شود [۲۴]. صمغ‌ها و موسیلاژهای موجود در گیاهان باعث افزایش فعالیت لیپوپروتئین لیپاز در بافت قلب و چربی می‌شوند. در نتیجه جذب لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌گلیسیرید توسط بافت‌های غیر از کبد به‌منظور تجزیه، بالا می‌رود که باعث کاهش تری‌گلیسیرید می‌شود و با توجه به این مطلب که بیشترین مقدار کلسترول در LDL وجود دارد، کاهش میزان کلسترول از میزان LDL می‌کاهد [۴۷، ۴۶].

به‌طور خلاصه نتایج این پژوهش بیانگر این مطلب بود که موسیلاژ موجود در غلاف میوه‌ی بامیه دارای اثرات هیپولیپیدمیک و هیپوگلاسمیک می‌باشد و تیمار موش‌های صحرایی دیابتی با موسیلاژ این گیاه موجب بهبود تغییرات نامطلوب بافت پانکراس، سطح گلوکز و پروفایل لیپیدی می‌گردد، هر چند اختلاف قابل توجهی در تاثیر دزهای مختلف این گیاه بر سطح پروفایل لیپیدی مشاهده نمی‌شود، لذا مصرف میوه این گیاه به‌عنوان غذا برای درمان کمکی دیابت پیشنهاد می‌شود.

### سیاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه جهت فراهم کردن مقدمات انجام پروژه حاضر با شماره ثبت ۱۳۸-۲ و از گروه بیوشیمی و بافت‌شناسی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه ارومیه بابت همکاری و مساعدت در انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی و هیستولوژیکی این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

## مآخذ

1. DeFronzo RA. Pathogenesis of type2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews*. 1997; 5: 177-269.
2. Mayfield J. Diagnosis and classification of diabetes mellitus: new criteria. *American Family Physician* 1998; 58(6): 1355-62.
3. Zarzycki W, Zieniewicz M. Reproductive disturbances in type 1 diabetic women. *Neuroendocrinology Letters* 2005; 26(6): 733-8.
4. Suji G, Sivakami S. Approaches to the treatment of diabetes mellitus: an overview. *Cellular and Molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 2003; 49(4): 635-9.
5. Bhattaram VA, Graefe U, Kohlert C, Veit M, Derendorf H. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine* 2002; 9: 1-33.
6. Zhang W, Zhao J, Wang J, Pang X, Zhuang X, Zhu X, Qu W. Hypoglycemic effect of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed residues in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytotherapy Research* 2010; 24(2): 228-32.
7. Adelakun OE, Oyelade OJ, Ade-Omowaye BI, Adeyemi IA, Van de Venter M. Chemical composition and the antioxidative properties of Nigerian Okra Seed (*Abelmoschus esculentus* Moench) Flour. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47(6): 1123-6.
8. Sengkhampan N, Bakx EJ, Verhoef R, Schols HA, Sajjaanantakul T, Voragen AG. Okra pectin contains an unusual substitution of its rhamnosyl residues with acetyl and alpha-linked galactosyl groups. *Carbohydrate Research* 2009; 344(14): 1842-51.
9. Maganha EG, da Costa Halmenschlager R, Rosa RM, Henriques JA, de Paula Ramos AL, Saffi J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry* 2010; 118(1): 1-0.
10. Sharma R, Arya V. A review on fruits having anti-diabetic potential. *J Chemical and Pharmaceutical Research* 2011; 3(2): 204-12.
11. Sabitha V, Panneerselvam K, Ramachandran S. In vitro  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitory effects in aqueous extracts of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. *Asian Pacific J Tropical Biomedicine* 2012; 2(1): 162-4.
12. Masoudi S, Oryan S, Hoseini FA, Fallahi R. The Efficacy of *Abelmoschus esculentus* Fruit on Insulin Control in Diabetic Male Wistar Rats. *www. sjimu. medilam. ac. ir*. 2016; 24(1): 133-43.
13. Roy A, Shrivastava SL, Mandal SM. Functional properties of Okra *Abelmoschus esculentus* L.(Moench): traditional claims and scientific evidences. *Plant Science Today*. 2014; 1(3): 121-30.
14. Kumar S, Dagnoko S, Haougui A, Ratnadass A, Pasternak D, Kouame C. Okra (*Abelmoschus* spp.) in West and Central Africa: potential and progress on its improvement. *African J Agricultural Research* 2010; 5(25): 3590-8.
15. Boban PT, Nambisan B, Sudhakaran PR. Hypolipidaemic effect of chemically different mucilages in rats: a comparative study. *British J Nutrition* 2006; 96(6): 1021-9.
16. Ahad HA, Rajesh V, Gupta MV, Lasya DN, Harish N, Khamartaz M. Fabrication and in vitro Evaluation of Glimperide *Hibiscus esculentus* Fruit Mucilage Sustained Release Matrix Tablets. *Int J PharmTech Res* 2010; 2:1.
17. Sancheti S, Bafna M, Seo SY. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant effects of *Chaenomeles sinensis* fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Food Research and Technology* 2010; 231(3):415-21.
18. Hosseinzadeh H, Ramezani MO, Danaei AR. Antihyperglycaemic effect and acute toxicity of *Securigera securidaca* L. seed extracts in mice. *Phytotherapy Research* 2002; 16(8):745-7.
19. Baradaran A, Madihi Y, Merrikhi A, Rafieian-Kopaei M, Nasri H. Serum lipoprotein (a) in diabetic patients with various renal functions not yet on dialysis. *Pak J Med Sci* 2013; 29(1): 354-7.
20. Woolfe JA. The effect of okra mucilage (*Hibiscus esculentus* L.) on the plasma cholesterol level in rats. *The Proceedings of the Nutrition Society* 1977; 36(2): 59A.
21. Choi JS, Yokozawa T, Oura H. Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of *Prunus davidiana* stems and its main component, prunin. *Planta medica* 1991; 57(03): 208-11.
22. Yanardağ R, Bolkent Ş, Özsoy-Saçan Ö, Karabulut-Bulan Ö. The effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on the kidney tissue, serum urea and creatinine levels of diabetic rats. *Phytotherapy Research* 2002; 16(8): 758-61.
23. Pushparaj PN, Low HK, Manikandan J, Tan BK, Tan CH. Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacology* 2007; 111(2): 430-4.
24. Ljubuncic P, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *J ethnopharmacology* 2005; 101(1): 153-61.
25. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research* 2001; 50(6): 537-46.
26. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes & Metabolic Disorders* 2013; 12(1): 60.

27. Lenzen S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51(2): 216-26.
28. Pereira DM, Valentao P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics from chemistry to biology. *Molecules* 2009; 14: 2202-11.
29. Abdelmoaty MA, Ibrahim MA, Ahmed NS, Abdelaziz MA. Confirmatory studies on the antioxidant and antidiabetic effect of quercetin in rats. *Indian J Clinical Biochemistry* 2010; 25(2): 188-92.
30. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological Research* 2005; 51(2): 117-23.
31. Jeong SM, Kang MJ, Choi HN, Kim JH, Kim JL. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutrition Research and Practice* 2012; 6(3): 201-7.
32. Daisy P, Balasubramanian K, Rajalakshmi M, Eliza J, Selvaraj J. Insulin mimetic impact of catechin isolated from *Cassia fistula* on the glucose oxidation and molecular mechanisms of glucose uptake on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Phytomedicine* 2010; 17(1): 28-36.
33. Pitchai D, Manikkam R. Hypoglycemic and insulin mimetic impact of catechin isolated from *Cassia fistula*: a substantiate in silico approach through docking analysis. *Medicinal Chemistry Research* 2012; 21(9):2238-50.
34. Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2003; 135(3): 357-64.
35. Dong J, Zhang X, Zhang L, Bian HX, Xu N, Bao B, Liu J. Quercetin reduces obesity-associated ATM infiltration and inflammation in mice: a mechanism including AMPK $\alpha$ 1/SIRT1. *J lipid Research* 2014; 55(3): 363-74.
36. Fogarty S, Hardie DG. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 2010; 1804(3): 581-91.
37. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *The J Physiology* 2006; 574(1): 7-15.
38. Pereira DF, Cazarolli LH, Lavado C, Mengatto V, Figueiredo MS, Guedes A, Pizzolatti MG, Silva FR. Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. *Nutrition* 2011; 27(11): 1161-7.
39. Hussain SA, Mahwi TO, Aziz TA. Quercetin dampens postprandial hyperglycemia in type 2 diabetic patients challenged with carbohydrates load. *International J Diabetes Research* 2012; 1(3):32-5.
40. Hussain SA, Mahwi TO, Aziz TA. Quercetin dampens postprandial hyperglycemia in type 2 diabetic patients challenged with carbohydrates load. *International J Diabetes Research* 2012; 1(3):32-5.
41. Ndong M, Uehara M, Katsumata SI, Suzuki K. Effects of oral administration of *Moringa oleifera* Lam on glucose tolerance in Goto-Kakizaki and Wistar rats. *J Clinical Biochemistry and Nutrition* 2007; 40(3): 229-33.
42. Jarret RL, Wang ML, Levy IJ. Seed oil and fatty acid content in okra (*Abelmoschus esculentus*) and related species. *J Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59(8): 4019-24.
43. Semenkovich C, Goldberg A, Goldberg I. Disorders of lipid metabolism. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Polonsky KS, Melmed S. *Williams textbook of endocrinology. 12th ed. United States: Saunders* 2011; 716-90.
44. Lecumberri E, Goya L, Mateos R, Alía M, Ramos S, Izquierdo-Pulido M, Bravo L. A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats. *Nutrition* 2007; 23(4): 332-41.
45. Romero AL, West KL, Zern T, Fernandez ML. The seeds from *Plantago ovata* lower plasma lipids by altering hepatic and bile acid metabolism in guinea pigs. *The J nutrition* 2002; 132(6): 1194-8.
46. Khogare DT. Effect of dietary fiber on blood lipid profile of selected respondent. *Int Food Res J* 2012; 19(1): 297-302.
47. Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *The Journal of Nutrition* 2003; 133(3): 700-6.

## **THE EFFECT OF MUCILAGE EXTRACTED FROM THE FRUIT OF ABELMOSCHUS ESCULENTUS ON SERUM GLUCOSE AND LIPID LEVELS AND REORGANIZATION OF BETA CELLS IN DIABETIC RATS**

Zahra Karampour Gebchag<sup>1\*</sup>, Seyyed Meysam Abtahi Froushani<sup>2</sup>, Farah Farokhi<sup>1</sup>

1. *Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran Faculty of education and sport sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran*

2. *Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*

### **ABSTRACT**

**Background:** Due to the progress of diabetes and the use of alternative herbal medicines, In this study, the effects of oral administration of the mucilage extracted from pods of *Abelmoschus esculentus* (Ae) fruits on serum levels of glucose, lipids and morphology of Langerhans islets in diabetic rats was investigated.

**Methods:** In this experimental study, 24 female wistar rats were randomly allocated into four groups (n=6): normal control (NC), diabetic control (DC) and 2 diabetic groups that received (oral) 300 and 500 mg/kg/body weight of *Abelmoschus esculentus*. After preparing and confirming the type of, mucilage extraction from the fruit's green okra was done by evaporation device in vacuum. Diabetes mellitus was induced by single dose intraperitoneal injection of streptozotocin 60mg/kg/body weight in diabetic groups. After 4 weeks, the serum levels of glucose and lipid profile of all groups were analyzed. Also morphology of Langerhans islets in the 4 groups was evaluated using H&E staining method. The data analyzed by SPSS software using ANOVA and Tukey tests.

**Results:** The results indicate a significant increase ( $P<0/05$ ) in glucose, cholesterol, triglyceride, LDL and significant decrease ( $P<0.05$ ) in HDL in diabetic rats compared to normal control. The use of the mucilage extracted from *A. esculentus* caused a significant decrease in serum levels of glucose, cholesterol, triglyceride, LDL and significant increase in serum level of HDL comparison with diabetic group.

**Conclusion:** according to the results of this study, the mucilage extracted from *A. esculentus* could be effective on control hyperlipidemia and hyperglycemia caused by diabetes mellitus.

**Keywords:** Diabetes, Streptozotocin, Glucose, Lipid profile, Okra mucilage

---

\*Iran, Urmia city, 11km SERO Road, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran. postal code:5756151818, Phone: +989332139884, Email: Zkarampour@yahoo.com