مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۶، شهریور ۱۳۹۶، ۵۰۴-۴۹۳

اثرات ضددیابتی و حفاظت کبدی عصاره الکلی قسمت تلخ گیاه *استویا ربادیانا* (*Stevia rebaudiana*) در موش سوری نر دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین

فریبا نجفی[۱]، نادر گودرزی[۲]، محمدمهدی زنگنه[۳]، اکرم زنگنه[۳]، لیدا حق نظری[۴]

دریافت مقاله:۹۶/۲/۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۳/۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۶/۴/۱۸ پذیرش مقاله: ۹۶/۴/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: گیاه *استویا ربادیانا*، اخیراً به‌عنوان یک عامل ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان شناخته شده است. با توجه به شیوع فزاینده دیابت، مطالعه حاضر جهت ارزیابی اثرات حفاظت کبدی و ضد دیابتی عصاره الکلی قسمت تلخ گیاه *استویا ربادیانا* در موش سوری نر دیابتی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، دیابت با تزریق داخل صفاقی ۶۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین در ۲۸ موش سوری نر بالغ القا شد و موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل منفی (دیابتی تیمار نشده) نرمال سالین و سه گروه دیگر به ترتیب ۰/۵ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن بدن گلی‌بنکلامید و ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر هر کیلوگرم وزن بدن عصاره الکلی *استویا ربادیانا* را ۱۵ روز به‌صورت گاواژ دریافت کردند. یک گروه نیز کنترل مثبت (غیردیابتی) در نظر گرفته شد. در روز پایان، سطوح گلوکز خون و آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز اندازه‌گیری شد. در مقاطع بافتی حجم تام کبد، سینوزوئیدها، هپاتوسیت‌ها، سیاهرگ مرکزی، سیاهرگ باب، سرخرگ کبدی و مجاری صفراوی تخمین زده شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Duncan تحلیل شدند.

یافته‌ها: عصاره الکلی *استویا ربادیانا* توانست قند خون را نسبت به گروه کنترل منفی به‌طور معناداری کاهش دهد ($p<۰/۰۵$). سطوح افزایش‌یافته آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز و حجم تام کبد، هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها پس از درمان با دوز بالای عصاره *استویا ربادیانا* نسبت به گروه‌های کنترل منفی و گلی‌بنکلامید کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد عصاره الکلی قسمت تلخ گیاه *استویا ربادیانا* می‌تواند قند خون را تنظیم نموده و از تخریب کبد در موش‌های سوری دیابتی شده پیشگیری نماید.

واژه‌های کلیدی: *استویا ربادیانا*، استرپتوزوتوسین، موش سوری، کبد

۱- استادیارگروه پوست، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیارگروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
تلفن: ۰۸۳-۳۸۳۲۲۵۹۹، پست الکترونیکی:n.goodarzi@razi.ac.ir
۳- دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۴- استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

مقدمه

دیابت یا بیماری قند، یک اختلال متابولیک در بدن است که در آن توانایی تولید انسولین از بین می‌رود و یا بدن در برابر انسولین مقاوم می‌شود و بنابراین انسولین تولیدی نمی‌تواند عملکرد طبیعی خود را انجام دهد. در این بیماری، بافت‌های بسیاری هم چون پانکراس، کلیه، کبد، مغز و قلب تحت تأثیر قرار می‌گیرند [۱]. کبد یک عضو وابسته به انسولین بوده و عملکرد آن به سطح انسولین خون و میزان حساسیت کبد به انسولین بستگی دارد [۲]. از طرف دیگر دیابت می‌تواند خطر ابتلای به برخی بیماری‌های کبدی را افزایش دهد. کنترل نامناسب قند خون خطر بروز کبد چرب را افزایش می‌دهد. سایر عوارض مرتبط با کنترل نامناسب در دیابت نظیر چاقی و کلسترول بالا نیز می‌توانند بروز کبد چرب را محتمل‌تر سازند. ازآنجاکه ارتباط تنگاتنگی بین سیروز کبدی و دیابت وجود دارد، افراد مبتلا به دیابت در معرض ابتلای به سیروز کبدی نیز هستند [۲]. استفاده از مکمل‌های درمانی نظیر مکمل‌های گیاهی می‌تواند در کاهش دیابت و عوارض ناشی از آن مؤثر باشد [۳]. استفاده از گیاهان در درمان بیماری‌ها از گذشته‌های دور تقریباً در همه کشورهای دنیا مرسوم بوده است [۵-۴]. داشتن حداقل میزان اثرات جانبی، کم‌هزینه و دردسترس بودن این گیاهان سبب جایگزین شدن تدریجی داروهای شیمیایی توسط گیاهان شده است [۸-۶]. در طب سنتی ایرانی، از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های مختلفی همچون بیماری‌های عصبی، عفونی، فشارخون، چربی خون به‌ویژه قند خون استفاده می‌شود [۱۱-۹].

گیاه *استویا ربادیانا* (*Stevia rebaudiana*) گیاهی از جنس *Stevia* و خانواده Asteraceae بومی کشورهای آمریکای جنوبی است [۱۲]. در ایران نیز این گیاه با نام *استویا* می‌روید. *استویا ربادیانا* گیاهی شیرین‌کننده بوده و قدرت شیرین‌کنندگی آن ۳۰۰-۱۵۰ برابر شکر گزارش شده است [۱۳]. در بسیاری از کشورهای دنیا استفاده از محصولات شیرین‌شده به‌وسیله گیاه *استویا* مورد استقبال قرار گرفته است [۱۴]. ترکیبات شیرین‌کننده مؤثره *استویا ربادیانا شامل* Steviozide، Rebaudioside A, B, C, D, E، Dolcosid A و Steviolbioside می‌باشند. این ترکیبات دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی می‌باشند [۱۵].

مطالعات نشان داده است این گیاه حداقل میزان کالری را داشته و مصرف خوراکی آن با اینکه چندین برابر شیرین‌تر از شکر است، قند خون را افزایش نمی‌دهد [۱۷-۱۶]. همچنین در مطالعه‌ای که بر روی افراد مبتلا به هایپرلیپیدمی صورت گرفته است، گیاه *استویا* چربی خون افراد را به‌صورت چشمگیری کاهش داده است [۱۸]. علاوه بر این، خواص ضدمیکروبی بسیار قوی گیاه *استویا ربادیانا* نیز مورد تأیید واقع شده است [۱۹]. ازاین‌رو، امروزه استفاده از گیاه *استویا ربادیانا* به‌عنوان شیرین‌کننده‌ای طبیعی در محصولات غذایی به‌ویژه برای افراد مبتلا به دیابت اهمیت زیادی پیدا کرده است [۱۷-۱۶].

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای بر روی بخش‌های مختلف گیاه *استویا* انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر، در وهله اول جداسازی قسمت تلخ گیاه *استویا ربادیانا* (قسمتی که با حس چشایی تلخ تشخیص داده می‌شود و فاقد ترکیبات شیرین‌کننده این گیاه است) از

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

قسمت شیرین آن برای اولین بار و سپس بررسی اثر ضد دیابتی و حفاظت کبدی قسمت تلخ آن در موش‌های سوری نر دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی در تابستان سال ۱۳۹۵ انجام شده است.گیاه *استویا ربادیانا* با شماره هرباریوم HUEM-۱۴۳۰۱ از محل دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی استان کرمانشاه جمع‌آوری گردید. بخش‌های هوایی گیاه در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط سایه خشک شد و سپس کاملاً خرد گردید. پودر خشک تا زمان آزمایش در فریزر یخچال (SXP45, LG Side By Side SXP45 Refrigerator, Korea) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. مقدار ۲۵۰ گرم از پودر گیاه با دقت وزن شده با ۷۵۰ میلی‌لیتر (به نسبت وزنی/حجمی ۱ به ۳) اتانول مطلق به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط و هم‌زمان هم زده شد. پس از ۲۴ ساعت، عصاره توسط کاغذ واتمن شماره ۲ (Whatman, UK) صاف شد. در ادامه، برای استخراج قسمت تلخ گیاه ابتدا با نرمال هگزان رسوب‌دهی شد و سپس عصاره اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلأ (روتاری با پمپ خلأ، Heidolph Collegiate, LABOROTA 4000, Germany) گردید و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و مدت‌زمان یک ساعت، حلال تبخیر شد و عصاره تغلیظ‌شده به دست آمد. به‌منظور خشک کردن عصاره گیاه، به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه دسیکاتور (Jeio Tech, Cubic model, SDC-30/30U, South Korea) قرار داده شد [۱۶]. بعد از تهیه عصاره الکلی، مقداری از آن برای انجام آنالیز کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی جرمی به سازمان جهاد دانشگاهی دانشگاه رازی ارسال شد.

برای انجام این تحقیق از ۳۵ موش سوری نر نژاد Balb/c با میانگین وزنی ۳±۳۶ گرم استفاده شد. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ساعته، دمای ۳۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد و بدون آلودگی صوتی بود. حیوانات در تمام طول آزمایش به آب و غذای مخصوص موش دسترسی داشتند. در ۲۸ موش سوری نر بالغ با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین، به مقدار ۶۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن، القای دیابت صورت گرفت. پس از سه روز، نمونه خون از ورید دمی موش‌ها گرفته شد و سطح قند خون به‌وسیله دستگاه گلوکومتر (GlucoDr AGM, 2200, South Korea) اندازه‌گیری شد. موش‌هایی که قند خون بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم در دسی لیتر داشتند به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند و به‌طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند. یک گروه ۷ تایی نیز به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. گروه اول، به‌عنوان کنترل مثبت (دیابتی‌نشده) در طی ۱۵ روز ۲۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به‌صورت گاواژ روزانه دریافت کردند. گروه دوم، به‌عنوان کنترل منفی (دیابتی تیمارنشده) در طی ۱۵ روز، ۲۰۰ میکرولیتر نرمال سالین به‌صورت گاواژ روزانه دریافت کردند. گروه سوم، به‌عنوان گروه تیمارشده با گلی‌بنکلامید در طی ۱۵ روز، گلی‌بنکلامید با دوز ۰/۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت گاواژ روزانه دریافت کردند. گروه‌های چهارم و پنجم، در طی ۱۵ روز به ترتیب با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

میکروگرم در هر کیلوگرم وزن بدن عصاره الکلی *استویا ربادیانا* به‌صورت گاواژ روزانه تیمار شدند. تمامی تجویزهای خوراکی به میزان ۰/۲ سی‌سی انجام شد [۱۶].

در این مطالعه در روزهای اول و هفتم با گرفتن نمونه خون از سیاهرگ دمی، میزان قند خون موش‌های سوری در تمامی گروه‌ها اندازه‌گیری شد. در پانزدهمین روز پس از القای دیابت، خون‌گیری از قلب موش‌ها انجام و سطح قند خون و همچنین آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (Aspartate aminotransferase; AST)، آلانین آمینوترانسفراز (Alanine aminotransferase; ALT) و آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase; ALP) آنها توسط کیت‌های پارس آزمون اندازه‌گیری شدند.

پس از تشریح موش‌های سوری کبد از بدن خارج شد و با استفاده از ترازوی دیجیتال (TX6000, Terraillon TX6000 Digital Scale, Germany) با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و حجم اولیه (Primary volume) با روش غوطه‌ورسازی تعیین گردید. در این روش، ظرفی حاوی آب مقطر بر روی ترازوی دیجیتال وزن و سپس اندام با نخ نازکی در آب غوطه‌ور شد، به‌طوری‌که اندام کاملاً در آب قرار داشت اما با کف و دیواره ظرف برخورد نداشت. تفاوت وزن جدید (پس از وارد شدن اندام در آب) و وزن اولیه آب مقطر، در چگالی آب مقطر ضرب و حجم اولیه برحسب سانتی‌متر مکعب به دست آمد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ روز در ظروف مخصوص نمونه‌برداری حاوی مایع ثبوت فرمالین بافر ۱۰ درصد نگهداری شدند [۲۰].

ازآنجایی‌که حجم اندام متعاقب ثبوت، پردازش بافتی و رنگ‌آمیزی دچار چروکیدگی (Shrinkage) می‌شود، برای تخمین حجم نهایی اندام بایستی میزان چروکیدگی را محاسبه نمود. تخمین میزان چروکیدگی به مقاطع ایزوتروپیک یکنواخت و تصادفی نیاز دارد. این مقاطع با استفاده از روش Orientator به دست آمد. در این روش، هر لوب کبد بر روی دایره‌ای که هر نیمه آن به ۱۰ قسمت برابر تقسیم شده است قرار گرفت. سپس یک عدد تصادفی بین ۰ تا ۱۰ انتخاب شده و لوب کبدی در جهت عدد انتخاب‌شده به دو نیمه برش داده شد. سطح برش هر نیمه موازی روی دایره دیگری که هر نیمه آن به ده قسمت نابرابر تقسیم شده است، قرار داده شد و دوباره با انتخاب یک عدد تصادفی بین ۰ تا ۱۰ در جهت عدد انتخاب‌شده برش داده شد. سپس تمام بافت در جهت برش دوم به مقاطع دو میلی‌متری برش داده شد. به‌طورکلی از هر کبد ۷ تا ۱۰ مقطع به‌طور تصادفی انتخاب گردید [۲۱-۲۰]. از یکی از مقاطع انتخاب‌شده، قطعه‌ای دایره‌ای شکل توسط یک تروکار برداشته و قطر آن توسط کولیس (Vernier caliper, 200 mm; Mitutoyo Corp, Kawasaki, Japan) اندازه‌گیری شد. سپس تمام مقاطع به‌دست‌آمده و قطعه پانچ‌شده در یک بلوک تحت پردازش معمول بافتی قرار گرفتند و مقاطع ۵ میکرونی از آنها تهیه و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت میزان چروکیدگی بافتی توسط فرمول زیر محاسبه گردید [۲۰]:

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

که در آن AA و AB به ترتیب مساحت نمونه دایره‌ای شکل بعد و قبل از پاساژ و رنگ‌آمیزی است. حجم نهایی یا حجم مرجع (Reference volume) نیز طبق فرمول زیر محاسبه گردید [۲۰]:

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

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

به‌منظور محاسبه حجم نسبی ساختارهای موردنظر (هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها، سیاهرگ باب، سرخرگ کبدی و مجاری صفراوی) از گرید (پروب) نقطه استفاده شد. برای تهیه گرید نقطه، در یک صفحه ترانسپرنت ۲۵ علامت + با فواصل طولی و عرضی ثابت (۵×۵) چاپ و گرید بر روی مانیتور نصب گردید. در بررسی میدان‌های دید، نقاط برخورد کرده با ساختارهای موردنظر که در پروب قرار داشتند مورد شمارش قرار گرفتند. حجم نسبی ساختارها با فرمول زیر محاسبه شد [۲۰]:

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

که در آن $\sum P_{structure}$ و $\sum P_{reference}$ به ترتیب مجموع نقاط برخورد کرده با ساختار موردنظر و مجموع نقاط پروب در n میدان دید است. برای تعیین حجم تام ساختارها، حجم نسبی در حجم مرجع ضرب شد [۲۰].

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. با توجه به کمی بودن متغیرها، ابتدا طبیعی بودن توزیع فراوانی آنها توسط آزمون ناپارامتری Kolmogorov-Smirnov تعیین شد (P>۰/۰۵). تساوی واریانس‌ها توسط آزمون Dunnett ارزیابی و تأیید شد. سپس میانگین متغیرهای کمی توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Duncan مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل به‌صورت انحراف‌معیار±میانگین گزارش شدند. سطح معناداری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی جرمی نشان داد Austroinulin بیشترین ترکیب موجود در عصاره الکلی گیاه *استویا ربادیانا* است. سایر ترکیبات موجود در عصاره این گیاه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- ترکیبات موجود در عصاره الکلی قسمت تلخ گیاه استویا ربادیانا

شماره	ترکیب	درصد
۱	Nerolidol	۱/۷۹
۲	Octadecanol	۳/۹۲
۳	Khusinol	۱/۰۱
۴	Manoyl oxide	۱/۹۲
۵	Epi-a-cadinol	۰/۴۶
۶	3-Keto-manoyl oxide	۰/۶۸
۷	Sphatulenol	۲/۸۹
۸	Austroinulin	۳۲/۹۳
۹	n-Tetracosane	۱۴/۰۸
۱۰	Jhanol	۶/۵۸
۱۱	n-Pentacosane	۹/۳۹
۱۲	b-Sitosterol۱۲	۰/۳
۱۳	3-a-Acetoxy-manol	۰/۷۵
۱۴	a-Amyrine	۰/۳
۱۵	b-Amyrine	۰/۳
مجموع		۷۷/۳

مقادیر قند خون در روزهای هفتم (نمونه‌های خون اخذشده از ورید دمی) و پانزدهم آزمایش (نمونه‌های خون اخذشده از قلب)، در گروه‌های تیمارشده با گلی‌بنکلامید و دوزهای مختلف عصاره الکلی *استویا* نسبت به گروه دیابتی تیمارنشده کاهش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

همچنین اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های تیمارشده با عصاره *استویا* و گلی‌بنکلامید مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقادیر آنزیم‌های کبدی AST و ALP در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره الکلی *استویا* نسبت به گروه‌های دیابتی تیمارنشده و دریافت‌کننده گلی‌بنکلامید کاهش معنی‌داری داشت و عصاره الکلی گیاه *استویا* توانست سطوح افزایش‌یافته این آنزیم‌ها را به حالت طبیعی نزدیک نماید (p<۰/۰۵). درحالی‌که مقدار آنزیم ALT در هیچ‌یک از گروه‌های تجربی تغییر معناداری نشان نداد (P>۰/۰۵) (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- میانگین قند خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در گروه‌های کنترل منفی سالم، منفی دیابتی و گروه‌های تیمار که با دوزهای مختلف عصاره الکلی گیاه استویا ربادیانا درمان شده‌اند (n=۷)

گروه‌ها	میزان قند خون (میلی‌گرم در دسی لیتر)		
	روز اول	روز هفتم	روز پانزدهم
گروه ۱	۹۷/۲۵±۳/۳۳^{a}	۷۵/۸۱±۵/۱۷^{c}	۶۲/۶۱±۳/۷۴^{b}
گروه ۲	۲۳۳/۸۱±۱۳/۳۱^{a}	۲۲۱±۱۲/۲۱^{a}	۲۳۶±۸/۸۷^{a}
گروه ۳	۲۱۰±۴۰^{a}	۱۸۵±۱۱/۹۴^{b}	۱۳۰±۷/۸۲^{c}
گروه ۴	۲۲۶/۴۱±۱۱/۱۹^{a}	۱۶۲/۵±۱۰/۵۳^{b}	۱۲۹/۴۱±۱۲/۳۵^{c}
گروه ۵	۲۲۵/۸۱±۶^{a}	۱۵۷/۸۱±۸/۵۲^{b}	۱۱۷/۲۱±۱۵/۶۴^{c}

گروه ۱: کنترل مثبت سالم، گروه ۲: کنترل منفی دیابتی، گروه ۳: تیمارشده با گلی‌بنکلامید، گروه ۴ و ۵: تیمارشده با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره استویا. حروف غیریکسان در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵). جهت مقایسه میانگین زوج گروه‌های موردمطالعه از آزمون Duncan استفاده شد. نتایج به‌صورت انحراف‌معیار±میانگین گزارش شده‌اند.

بررسی‌های استریولوژیک نشان داد وزن و حجم کبد در گروه دریافت‌کننده دوز بالای عصاره الکلی *استویا* نسبت به گروه‌های دیابتی درمان‌نشده و دریافت‌کننده گلی‌بنکلامید کاهش معنی‌داری دارد (P<۰/۰۵). همچنین حجم هپاتوسیت‌ها در هر دو گروه دریافت‌کننده دوز پایین و بالای عصاره، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی درمان نشده داشت (P<۰/۰۵). علاوه بر آن، اختلاف بین دوزهای پایین و بالای عصاره نیز معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). حجم سینوزوئیدها در گروه تیمار شده با دوز بالای عصاره *استویا* نسبت به گروه دیابتی درمان نشده و گروه دریافت‌کننده گلی‌بنکلامید کاهش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). حجم سیاهرگ مرکزی، سیاهرگ باب، سرخرگ کبدی و مجاری صفراوی در گروه دیابتی درمان‌نشده نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵) و تأثیر عصاره الکلی *استویا* بر حجم ساختارهای مذکور نیز معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) (جدول ۴).

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

جدول ۳- میانگین آنزیم‌های کبدی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) در گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار که با دوزهای مختلف عصاره الکلی گیاه استویا ربادیانا درمان شده‌اند (n=۷)

گروه‌ها	آنزیم‌های کبدی (انحراف معیار± میانگین)		
	آلانین ترانسفراز	آلکالین فسفاتاز	آسپارتات آمینوترانسفراز
گروه ۱	۲۱۲±۲۱/۶۱[b]	۳۶/۳۳±۵/۳۶[a]	۲۷۶±۹۲[c]
گروه ۲	۲۱۵± ۴۳[b]	۴۰/۷۵±۶/۰۲[a]	۳۴۶/۵۱±۱۲۳/۹۵[a]
گروه ۳	۲۹۸/۸۲± ۱۰۸[a]	[a]۳۷/۲۲±۵/۹۱	۳۳۹/۸۱±۱۵۶/۶۱[a]
گروه ۴	۱۹۷/۶۱±۷۴/۷۱[c]	۳۶±۵/۷۱[a]	۳۱۲/۸۱±۸۲/۶۲[b]
گروه ۵	۱۹۵/۸۱±۷۷/۵۲[c]	۳۶/۸۱±۹/۸۱[a]	۳۰۶±۹۲/۱۱[b]

گروه ۱: کنترل مثبت سالم، گروه ۲: کنترل منفی دیابتی، گروه ۳: تیمارشده با گلی‌بنکلامید، گروه ۴ و ۵: تیمارشده با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره استویا. در هر یک از آنزیم‌های کبدی حروف غیریکسان در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵). جهت مقایسه میانگین زوج گروه‌های موردمطالعه از آزمون Duncan استفاده شد. نتایج به‌صورت انحراف‌معیار±میانگین گزارش شده‌اند.

جدول ۴- میانگین (میلی‌گرم) و حجم تام (میلی‌متر مکعب) کبد و ساختارهای کبدی در گروه‌های کنترل و گروه‌های تیمار که با دوزهای مختلف عصاره الکلی گیاه استویا ربادیانا درمان شده‌اند (n=۷)

گروه‌ها	وزن کبد	حجم (انحراف معیار± میانگین)						
		کبد	هپاتوسیت	سینوزوئیدها	سیاهرگ مرکزی	سیاهرگ باب	سرخرگ کبدی	اری صفراوی
گروه ۱	۱۳۳۰±۲۷۰	۱۳۰۹±۳۵۰	۹۷۵±۱۳۸	۷۵±۲۲	۱۶۱±۲۶	۶۵±۲۱	۸±۱/۱۵	۱۶±۵
گروه ۲	[b]۱۴۳۰±۲۷۰	[b]۱۴۱۵±۳	[b]۱۰۵۲±۳۱/۵۱	[a] ۱۱۹±۱۴/۵۲	۱۷۱/۶۵±۱۹/ ۶۱[a]	[a] ۵۵/۳۱±۱۰/۲۱	۱۱±۴[b]	[a]۱۷±۴/۵۱
گروه ۳	[a]۱۵۵۰±۱۶۰	[a]۱۵۱۸±۱۵	[a]۱۱۵۱±۲۶/۵۱	[a]۱۱۳/۴۱±۹/۷۱	[b]۱۳۴/۲۱±۱۳/۳۲	[a]۶۶/۲±۸/۵	[a]۱۶/۶۱±۵/۵۱	[a]۱۹/۴۱±۶/۷۲
گروه ۴	[a]۱۵۳۰±۱۷۰	[a]۱۵۰۰±۱۲/۸۱	[a]۱۱۷۴±۵۲/۶	[a]۹۷/۲۵±۱۱/۱۴	[b]۱۴۰/۷۵±۲۱/۲۵	[a]۶۰/۷۵±۱۰/۷۱	[b]۹/۷۵±۲/۲۱	[a]۱۵/۵۱±۶/۵۷
گروه ۵	[a]۱۳۵۰±۱۸۰	[a]۱۲۹۲±۳۷	[b]۸۳/۶۲±۱۱/۵۱	[c]۹۴۰/۶۱±۴۴/۶۱	[a]۱۶۱/۳۱±۱۵/۵۶	[a]۵۱±۱۲/۵۱	[b]۹/۱۶±۳/۵۲	[a]۱۶±۵/۵۳

گروه ۱: کنترل مثبت سالم، گروه ۲: کنترل منفی دیابتی، گروه ۳: تیمارشده با گلی‌بنکلامید، گروه ۴ و ۵: تیمارشده با دوز ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در هر کیلوگرم وزن بدن از عصاره استویا. در هر یک از حجم‌ها و وزن کبد حروف غیریکسان هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵). جهت مقایسه میانگین زوج گروه‌های موردمطالعه از آزمون Duncan استفاده شد. نتایج به‌صورت انحراف‌معیار±میانگین گزارش شده‌اند.

بحث

از گذشته‌های دور تاکنون از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌های مختلفی نظیر مسمومیت‌ها و نارسایی‌های کبدی استفاده شده است. در این زمینه توجه به عصاره‌های گیاهی برای درمان بیماری‌های گوناگون همواره مورد توجه قرار گرفته است [۲۲-۲۱، ۱۶]. در بین استخراج‌های مختلفی که روی گیاهان دارویی صورت می‌گیرد، عصاره‌های الکلی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد از تخریب سلول‌های بدن به‌ویژه سلول‌هایی نظیر هپاتوسیت‌ها که در تماس مستقیم با رادیکال‌های آزاد هستند، جلوگیری کنند [۲۳]. در این

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

مطالعه، مشخص شد که Austroinulin بیشترین ترکیب موجود در عصاره الکلی قسمت تلخ گیاه *استویا* است. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که Austroinulin با از بین بردن رادیکال‌های آزاد و ممانعت از تولید اکسید نیتروژن و سیتوکین‌های پیش‌التهابی، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی خود را اعمال می‌کند [۲۴].

نتایج بیوشیمیایی به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از عصاره الکلی بخش تلخ گیاه *استویا ربادیانا*، قند خون و افزایش ترانس‌آمینازهای کبد ناشی از مسمومیت با استرپتوزوتوسین را کاهش می‌دهد. این آنزیم‌ها که به‌طور طبیعی در سلول‌های کبدی ساخته می‌شوند، در هنگام آسیب سلول‌ها به دلیل اختلال در غشای پلاسمایی وارد جریان خون می‌شوند و سطوح سرمی آنها افزایش می‌یابد. به همین علت، افزایش این آنزیم‌ها را می‌توان به آسیب در یکپارچگی ساختار و عملکرد مناسب کبد نسبت داد. بنابراین اندازه‌گیری این آنزیم‌ها و همچنین بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی معیارهای مناسبی برای ارزیابی عملکرد کبد محسوب می‌گردند [۲۵]. نتایج حاصل از این مطالعه، بیانگر کاهش معنادار آنزیم AST در گروه‌های تیمارشده با عصاره *استویا* در مقایسه با گروه کنترل منفی و گروه دریافت‌کننده گلی‌بنکلامید است؛ اما آنزیم ALT اختلاف معناداری در بین گروه‌ها نشان نداد. در مطالعه Assaei و همکاران، گزارش شد که گیاه *استویا ربادیانا* سبب کاهش میران آنزیم‌های ALT و AST در دیابت القاشده توسط استرپتوزوتوسین می‌شود [۲۶]. در این آزمایش، استفاده از گیاه *استویا ربادیانا*، موجب کاهش در آنزیم ALP شد. یکی از جایگاه‌های تولید این آنزیم، هپاتوسیت‌ها می‌باشد. در آسیب‌های کبدی، مقادیر این آنزیم به‌شدت افزایش می‌یابد. کاهش مقدار این آنزیم در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره *استویا* نسبت به سایر گروه‌ها، بیانگر اثر این عصاره در افزایش قدرت سم‌زدایی کبد است. در مطالعه Akbarzadeh و همکاران نیز نشان داده شد که گیاه *استویا ربادیانا* سبب کاهش معنادار آنزیم ALP در گروه‌های دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین می‌شود [۲۷].

مطالعات استریولوژیکی نشان می‌دهد که وزن و حجم کبد و همچنین حجم هپاتوسیت‌ها در گروه دریافت‌کننده دوز بالای عصاره الکلی *استویا* نسبت به سایر گروه‌های دیابتی کاهش بیشتری یافته است. افزایش تولید رادیکال‌های آزاد توسط استرپتوزوتوسین احتمالاً باعث نقص عملکرد میتوکندری‌ها در موش‌های دیابتی می‌شود. افزایش چشمگیر تعداد میتوکندری‌ها و کاهش واضح در گرانول‌های گلیکوژن با هیپرتروفی هپاتوسیت‌ها مشخص می‌شود. این تغییرات و به‌تبع آن افزایش در حجم هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها و در نهایت افزایش حجم و وزن کبد از جمله ویژگی‌هایی هستند که در موش‌های دیابتی گزارش شده است [۲۵]. این یافته نیز نشان‌دهنده قدرت بالای آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی این گیاه در دوز بالا است. مهم‌ترین ترکیب آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی موجود در قسمت تلخ گیاه *استویا*، Austroinulin است. در مطالعه Bo و همکاران نشان داده شد که Austroinulin تولید نیتریک اکسید و سیتوکین‌های پیش‌التهابی (نظیر اینترلوکین-۶) را مهار می‌کند و از این طریق مانع از التهاب در موضع می‌گردد [۲۸].

در این مطالعه به دلیل محدودیت‌های موجود، حجم انفرادی هپاتوسیت‌ها و حجم هسته آنها بررسی نگردید.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

لذا پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آینده تغییرات این پارامترها متعاقب دیابت در بافت کبد و اثرات احتمالی عصاره گیاه *استویا* بر آنها بررسی گردد. در همین راستا لازم است اثرات مصرف طولانی‌مدت عصاره تهیه‌شده بر روی اندام‌های حیاتی مانند کبد و کلیه بیماران دیابتی مورد بررسی قرار گیرد تا فواید و عوارض جانبی احتمالی آن بیشتر مشخص گردد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که عصاره الکلی گیاه *استویا ربادیانا*، به‌ویژه در دوز بالا، می‌تواند در جلوگیری از تغییرات آنزیم‌های نشانگر کبد (AST، ALT و ALP) و همچنین در تنظیم قند خون در موش‌های سوری دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین مؤثر واقع گردد. همچنین به نظر می‌رسد این عصاره بتواند ساختار کبد را بهبودی ببخشد و از تخریب بافت آن در بیماری دیابت پیشگیری نماید.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری‌های گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی کرمانشاه در تهیه نمونه‌های سرمی و اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

References

[1] Shoback, edited by David G. Gardner, Dolores. Chapter 17. Greenspan's basic & clinical endocrinology (9th ed). New York: McGraw-Hill Medical. 2011; pp: 35-8.

[2] Androli T, Carpenter C, Griggs R, Benjamin I. Diseases of the Liver and Biliary System. in: Cecil's Essentials of Medicine (7th ed). USA: WB Saunders Company. 2007; pp: 23.

[3] Belayneh A, Bussa NF. Ethnomedicinal plants used to treat human ailments in the prehistoric place of Harla and Dengego valleys, eastern Ethiopia. *J Ethnobiol Ethnomed* 2014; 10(18): 1-17.

[4] Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Patch CS, Sullivan DR, Fenech M, et al. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *Med J Aust* 2006; 185(4): 4-24.

[5] Foroughi A, Pournaghi P, Najafi F, Zangeneh A, Zangeneh MM, Moradi R. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical screening of *Pimpinella anisem*'s essential oil. *Int J Pharm Phytochem Res* 2016; 8(11); 1886-90.

[6] Sherman PW, Hash GA. Why vegetable recipes are not very spicy. *Evol Hum Behav* 2001; 22(3): 147-163.

[7] Stepp JR. The role of weeds as sources of pharmaceuticals. *J Ethnopharmacol* 2004; 92 (2–3): 163–6

[8] Moradi R, Hajialiani M, Zangeneh MM, Zangeneh A, Tahvilian R, Hidaryan H, et al. Antibacterial Properties of an Iranian Ethnomedicinal Plant. *Int J Ayu Pharm Chem* 2017; 6(3): 128-37.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

[9] Stepp JR Moerman DE. The importance of weeds in ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol* 2001; 75(1): 19-23.

[10] Najafi F, Tahvilian R, Zangeneh MM, Zangeneh A, Moradi R. Medicinal plant: Assessment of the chemical composition and in vitro antibacterial activities of the *Viola odorata Linnoil's* against *Bacillus subtilis* (ATCC No. 21332) in west of Iran. *Int J Sci Eng Res* 2016; 7(11): 1330-9.

[11] Faramarzi E, Zangeneh MM, Zangeneh A, Moradi R. Effect of *Cinnamomum zelanicum on* oil on hyponeophagia anxiety test in Balb C male mice. *Onl JVet Res* 2017; 21(2): 77-80.

[12] Zangeneh MM, Najafi F, Moradi R, Tahvilian R, Haghnazari L, Zangeneh A. Evaluation of the in vitro antibacterial activities of alcoholic extract of *Stevia rebaudiana* against *Escheriachia coli O157: H7* (ATCC No. 25922). *Asian J Pharm Anal Med Chem* 2016; 4(3): 131- 6.

[13] Zangeneh MM, Najafi F, Tahvilian R, Haghnazari L, Zangeneh A, Abiari M, et al. Study on the in vitro antibacterial properties of alcoholic extract of *Stevia rebaudiana* in west of Iran. *Int J Sci Eng Res* 2016; 7(11): 1352-9.

[14] Misra H, Soni M, Silawat N, Mehta D, Mehta BK, Jain DC. Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J Pharm Bioallied Sci* 2011; 3(2): 242–8.

[15] Atteh JO, Onagbesan OM, Tona K, Decuypere E, Geuns JM, Buyse J. Evaluation of supplementary *Stevia* (*Stevia rebaudiana*, bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2008; 92(6): 640-9.

[16] Hagh-Nazari L, Goodarzi N, Zangeneh MM, Zamgeneh A, Tahvilin R, Moradi R. Stereological study of kidney in streptozotocin-induced diabetic mice treated with ethanolic extract of *Stevia rebaudiana* (bitter fraction). *Comp Clin Pathol* 2017; 26(2): 455-63.

[17] Agarwal V, Kochhar A, Sachdeva R. Sensory and Nutritional Evaluation of Sweet Milk Products Prepared Using *Stevia* Powder for Diabetics. *Ethno Med* 2010; 4(1):9-13.

[18] Da Silva GES, Assef AH, Albino CC, Funari Ferri LDA, Tasin G, Takahashi MH, et al. Investigation of the tolerability of oral stevioside in Brazilian hyperlipidemic patients. *Braz Arch Biol Technol* 2006; 49(4): 583-7.

[19] Zangeneh MM, Poyanmehr M, Najafi F, Zangeneh A, Moradi R, Tahvilian R, et al. In vitro antibacterial activities of ethanolic extract of *Stevia rebaudiana* against *Bacillus subtilis* (ATCC No. 21332). *Int J Res Pharma Nano Sci* 2016; 5(6): 320-5.

[20] Noorafshan A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. *Ann Anat* 2014; 196: 57-66.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

[21] Zangeneh MM, Najafi F, Tahvilian R, Salmani S, Haghnazari L, Zangeneh A, et al. Ethnomedicinal Plants: *In vitro* Antibacterial Effects of Ethanolic Extract of *Stevia rebaudiana*. *Int J Ayu Pharm Chem* 2017; 6(1): 251-9.

[22] Tahvilian R, Hajialiani M, Yazdani H, Zangeneh A, Zangeneh MM, Moradi R, et al. Investigate a plant product as an anxiolytic agent. *IJCMPR* 2017; 3(2): 1374-7.

[23] Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga LL. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plant extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2011; 8(1): 1-10.

[24] Han YK, Kim YS, Natarajan SB, Kim WS, Hwang JW, Jeon NJ, et al. Antioxidant and anti-Inflammatory effects of Chaenomeles sinensis leaf extracts on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Molecules* 2016; 21(4): 422.

[25] Nyblom H, Björnsson E, Simrén M, Aldenborg F, Almer S, Olsson R. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver Int* 2006; 26(7): 840–5.

[26] Assaei R, Mokarram P, Dastghaib S, Darbandi S, Darbandi M, Zal F, et al. Hypoglycemic Effect of Aquatic Extract of *Stevia* in Pancreas of Diabetic Rats: PPARγ-dependent Regulation or Antioxidant Potential. *Avicenna J Med Biotechnol* 2016; 8(2): 65–74.

[27] Akbarzadeh S, Eskandari F, Tangestani H, Bagherinejad ST, Bargahi A, Bazzi P, et al. The effect of *Stevia rebaudiana* on serum omentin and visfatin level in STZ-induced diabetic rats. *J Diet Suppl* 2015; 12(1): 11-22.

[28] Cho BO, Ryu HW, So Y, Cho JK, Woo HS, Jim CH, Seo Kl, Park JC, Jeong IY. Anti-inflammatory effect of austroinulin and 6-O-acetyl-austroinulin from *Stevia rebaudiana* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 2013; 62:638-44.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]

Antidiabtic and Hepatoprotective Effects of Bitter Fraction of *Stevia rebaudiana* Alcoholic Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Male Mice

F. Najafi[1], N. Goodarzi[2], M.M. Zangeneh[3], A. Zangeneh[3], L. Hagh-Nazari[4]

Received: 23/04/2017 Sent for Revision: 27/05/2017 Received Revised Manuscript: 09/07/2017 Accepted: 10/07/2017

Background and Objective: *Stevia rebaudiana* has been recently known as an anti-inflammatory and antioxidant agent. Due to the increasing prevalence of diabetes, the present study was performed to investigate the hepatoprotective and antidiabetic effects of bitter fraction of *Stevia rebaudiana* alcoholic extract on diabetic male mice.

Materials and Methods: In this experimental study**,** diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin at a dose of 60 mg/kg in 28 male mice and they were randomly divided into 4 groups. The negative control group (untreated diabetic) received normal saline and the other three groups received glibenclamide at a dose of 0.5 mg/kg and alcoholic extract of *S. rebaudiana* at doses of 200 and 400 µg/kg, respectively, through gavage for 15 days. One group was considered as the positive control (non-diabetic). On the last day, levels of blood glucose, ALT (Alanine aminotransferase), AST (Aspartate aminotransferase) and ALP (Alkaline phosphatase) enzymes were measured. Total volume of the liver, hepatocytes, sinusoids, portal veins, central veins, hepatic arteries, and bile ducts were estimated in histological sections. The data were analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan post hoc test.

Results: Alcoholic extract of *S. rebaudiana* could decrease blood glucose levels significantly ($p<0.05$) compared to the negative control group. The increased levels of AST and ALP enzymes as well as the total volume of liver, hepatocytes, and sinusoids decreased significantly after treatment with high dose of *S. rebaudiana* extract in comparison with the negative control and glibenclamide groups ($p<0.05$).

Conclusion: It seems that bitter fraction of *S. rebaudiana* alcoholic extract can regulate the blood glucose and inhibits hepatic damages in diabetic mice.

Key words: *Stevia rebaudiana*, Streptozotocin, Mice, Liver

Funding: There was no fund for this study.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethical Committee of Razi University approved the study.

How to cite this article: Najafi F, Goodarzi N, Zangeneh MM, Zangeneh A, Hagh-Nazari L. Antidiabtic and Hepatoprotective Effects of Bitter Fraction of *Stevia rebaudiana* Alcoholic Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Male Mice. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2017; 16(6): 493-504. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Dermatology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran
2- Assistant Prof., Dept. of Basic and Pathobiology Science, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran (Corresponding Author)Tel: (083)8322599, Fax: (083)8322599, E-mail: n.goodarzi@razi.ac.ir
3 - Student of D.V.M, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
4 - Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1396.16.6.3.5]