

تأثیر همزمان شیره خشک گیاه استبرق (*Calotropis procera* (Willd.) R. Br.) و ویتامین C بر فاکتورهای سرمی موش‌های دیابتی نوع ۱

فریده ملائی نژاد^۱، فرشته عزتی قادری^{۲*}، عبدالله رمضانی قرا^۳ و سعید رضایی زارچی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور واحد تفت، یزد، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه چیرفت، کرمان، ایران

f.ezzati@ujiroft.ac.ir :fezzatighadi@yahoo.com پست الکترونیک:

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه چیرفت، کرمان، ایران

۴- استادیار، گروه زیست، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور واحد تفت، یزد، ایران

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۶

چکیده

در این مطالعه سعی شد تا به خواص ضد دیابتی شیره خشک گیاه استبرق (*Calotropis procera* (Willd.) R. Br.) به همراه ویتامین C در موش‌های دیابتی شده توسط STZ پرداخته شود. دیابت در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی توسط تک دوز STZ (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) به صورت تزریق درون صفاقی ایجاد گردید. ۳۰ سر موش نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به شش گروه به شرح زیر تقسیم شدند. گروه اول (کنترل، گروه دوم) دیابتی، گروه سوم) موش‌های دیابتی که با شیره استبرق ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند. گروه (چهارم) گروهی که توسط شیره استبرق (۲۰۰mg/kg) و ویتامین C (۱۰۰mg/kg) تیمار شدند، گروه پنجم) تیمار روزانه توسط شیره استبرق (۲۰۰mg/kg)، گروه ششم) حیوانات این گروه روزانه با ویتامین C (۲۰۰mg/kg) تیمار شدند. در پایان دوره ۱۵ روزه فاکتورهای بیوشیمیابی قند خون، کلسترول تام، تری‌گلیسرید و هموگلوبین گلیکه (HbA_{1c}) بررسی شد. نتایج نشان داد که میزان قند خون، کلسترول تام، تری‌گلیسرید و هموگلوبین گلیکه (HbA_{1c}) در گروه دیابتی به طور معنی‌داری افزایش داشته است. تیمار گروه‌های دیابتی توسط شیره خشک استبرق و همچنین ترکیب شیره استبرق و ویتامین C باعث کاهش معنی‌داری میزان فاکتورهای بیوشیمیابی بالا گردید. نتایج نشان داد که شیره استبرق به تهایی نسبت به گروه چهارم تأثیر بهتری بر فاکتورهای بیوشیمیابی سرم داشته است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که شیره خشک گیاه استبرق به تهایی قادر به کاهش قند خون و همچنین عوارض ناشی از دیابت در افراد دیابتی نوع ۱ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هیپرگلیسمی، هیپرلیپیدمی، گیاه استبرق (*Calotropis procera* (Willd.) R. Br.), ویتامین C.

از دیر باز به عنوان یکی از گیاهان دارویی در طب سنتی در کشورهای مختلفی مانند عربستان، هند، آفریقا و همچنین ایران استفاده می‌شده است. این گیاه دارای گلهای سفید یا صورتی است که بین ماه خرداد و تیر می‌روید. در طب سنتی

مقدمه گیاه استبرق با نام علمی *Calotropis procera* متعلق به خانواده Asclepiadaceae و طول ۶ متر می‌باشد. گیاه استبرق در مناطق گرمسیری و بیابانی رشد می‌کند. این گیاه

(Hillstrom *et al.*, 2003; 1994).

امروزه یکی از راههای مؤثر و رایج درمان دیابت نوع یک تزریق انسولین است. بنابراین مطالعه و بررسی منابع آنتیاکسیدانی طبیعی با عوارض کم بسیار لازم و ضروریست. با توجه به اینکه در هیچ یک از مطالعات انجام شده قبلی شیره گیاه استبرق و ویتامین C توأم در درمان دیابت نوع ۱ بررسی نشده است، بنابراین، این مطالعه بهمنظور بررسی تأثیر شیره گیاه استبرق و ویتامین C در موش‌های دیابتی شده انجام شده است.

مواد و روشها

جمع آوری گیاه

شیره گیاه استبرق پس از تأیید جنس و گونه این گیاه توسط گیاهشناس هریاریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه جیرفت، در فصل پاییز در منطقه جنوب کرمان (جیرفت) جمع آوری شد. بدین منظور پس از شناسایی گیاهان توسط کارشناس، برای برطرف شدن گردودخاک و آلودگی با آب شستشو داده و بعد توسط تیغ سرشاخه‌های جوان را بریده و شیره گیاه در ظرفی شیشه‌ای جمع آوری گردید. شیره گیاه در دمای اتاق و دور از نور خورشید خشک شد. سپس ماده خشک حاصل را توسط آسیاب پودر کرده و دور از نور و رطوبت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

بررسی قابلیت حذف رادیکال DPPH

این روش به عنوان یکی از روش‌های متداول برای اندازه‌گیری فعالیت آنتیاکسیدانی نمونه‌های گیاهی می‌باشد. این روش براساس احیاء رادیکال آزاد DPPH به وسیله آنتیاکسیدان است که رنگ بنفش محیط به زرد تبدیل می‌گردد که کاهش شدت جذب با دستگاه طیفسنجری قابل اندازه‌گیری است. بنابراین بهمنظور بررسی میزان فعالیت آنتیاکسیدانی شیره استبرق، درصد مهار DPPH به روش Shimada و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH ۰٪ میلی‌مولار تهیه شده در

شیره گیاه استبرق به عنوان داروی ضد دیابت، تقویت‌کننده کبد و ضد سرطان استفاده می‌گردد (Padhy *et al.*, 2007). در عربستان سعودی از گیاه استبرق معمولاً در طب سنتی برای درمان اسپاسم عضلانی و درد مفاصل استفاده می‌شود. در طب سنتی آفریقا از این گیاه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله مalaria و عارضه پوستی استفاده می‌گردد (Kumar *et al.*, 2010).

دیابت در حال حاضر یک تهدید جهانی است. دیابت نوع ۱ به عنوان اختلال متابولیک و از بین رفتن توانایی تولید انسولین در بدن می‌باشد. نقش اصلی انسولین پایین آوردن قند خون توسط سازوکارهای مختلف است. از آنجا که در درمان دیابت سرعت و توانایی بدن در استفاده و سوخت‌وساز کامل گلوکز کاهش می‌یابد، از این رو میزان قندخون افزایش می‌یابد (هیبرگلیسمی). زمانی که این افزایش قند در درازمدت در بدن وجود داشته باشد عوارض میکروسکولار دیابت ایجاد می‌شود که می‌تواند اعضاً مختلف بدن همانند کلیه، چشم و اعصاب را درگیر نماید (Dimova *et al.*, 2017). علاوه بر عوامل غدد آندوکرین، فاکتورهای دیگری در ایجاد بیماری دیابت و عوارض آن مؤثرند که شامل استرس اکسیداتیو، کاهش سطح آنتیاکسیدان‌ها و همچنین آزادسازی سیتوکین‌ها می‌باشند (Zhang & Tan, 2000). رادیکال آزاد به عنوان محصول فرعی غیر قابل اجتناب تنفس میتوکندری به طور پیوسته از احیاء مولکول اکسیژن به آب تولید می‌گردد. رادیکال آزاد با الکترون جفت‌نشده خود قادرند به چربی‌ها، بروتین‌ها و اسیدهای نوکلئیک صدمه برسانند. اینها اصطلاحاً اکسیژن فعل واکنش‌دهنده (ROS) نامیده می‌شوند (Lobo *et al.*, 2010). مطالعات بسیاری نشان داده است که مصرف آنتیاکسیدان‌های با منشأ گیاهی حاوی ترکیب‌های پلی‌فنولی و ویتامین‌ها در حفظ سلامت انسان مؤثر می‌باشد (Wang *et al.*, 2012; Fraga *et al.*, 2010).

ویتامین C از نظر ساختاری شبیه گلوکز است که در بسیاری از فعل و انفعالات شیمیایی به طور رقابتی جایگزین گلوکز می‌شود، بنابراین از گلیکوزیله شدن غیرآنزیمی بروتین‌های بدن از جمله هموگلوبین جلوگیری کرده و در Hallfrisch *et al.*, 1992) پیشگیری از عوارض دیابت مؤثر است.

(۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دما در محدوده 23 ± 2 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس به منظور بررسی تأثیر شیره استبرق و ویتامین C موش‌ها در شش گروه پنج تایی تقسیم شدند که گروه‌های تیمار شامل: گروه اول (کنترل): موش‌های این گروه به طور آزادانه دسترسی به آب و مواد غذایی داشته و هیچگونه تیماری بر روی این گروه انجام نشد.

گروه دوم (شاهد دیابتی): در این گروه به منظور ایجاد مدل دیابتی از تک دوز STZ به میزان ۵۰ میلی گرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن محلول در سرم فیزیولوژی $9/0\%$ استفاده گردید و به صورت درون صفاقی تزریق شد (Gajdosik *et al.*, 1999). موش‌ها قبل از تزریق به مدت ۱۰ ساعت ناشتا بوده و بعد از ۴۸ ساعت از عمل تزریق میزان قند خون آنها بررسی شد. گروه سوم (دیابتی + شیره گیاه استبرق): این گروه همانند گروه دوم دیابتی گردید و پس از اطمینان از دیابتی شدن روزانه ۲۰۰ میلی گرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن شیره گیاه استبرق و ۱۰۰ میلی گرم ویتامین به‌ازای کیلوگرم وزن بدن از طریق گاواز دریافت کردند (Alrheam & Saad-Al Shehri, 2015).

گروه چهارم (دیابتی + شیره گیاه استبرق و ویتامین C): این گروه همانند گروه دوم دیابتی گردید و پس از اطمینان از دیابتی شدن روزانه ۲۰۰ میلی گرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن شیره گیاه استبرق و ۱۰۰ میلی گرم ویتامین به‌ازای کیلوگرم وزن بدن از طریق گاواز دریافت کردند (Iwata *et al.*, 2014). گروه پنجم (کنترل+شیره استبرق): حیوانات این گروه علاوه‌بر دسترسی آزاد به آب و غذا روزانه ۲۰۰ میلی گرم به‌ازای کیلوگرم وزن بدن شیره خشک گیاه استبرق محلول در آب مقطر از طریق گاواز دریافت نمودند.

گروه ششم (کنترل+ویتامین C): موش‌های این گروه علاوه‌بر دسترسی آزاد به آب و غذا روزانه ۱۰۰ میلی گرم ویتامین C (شرکت مرک) به‌ازای کیلوگرم وزن بدن، محلول در آب مقطر از طریق گاواز دریافت کردند.

طول مدت دوره تیمار ۱۵ روز و پس از پایان دوره خون‌گیری از حیوانات انجام شد. در شروع آزمایش برای اطمینان از دیابتی بودن نمونه‌ها، آنها را با استفاده از کلروفرم

اتanol ۹۵٪ با ۳ میلی‌لیتر از شیره استبرق با غلظت‌های متفاوت ۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مخلوط گردید. محلول بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Perkin elemer ساخت کشور آلمان مدل ۲۵ Lambda خوانده شد. آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد با غلظت‌های مشخص در سنجه‌شیوه طرفیت آنتی‌اکسیدانی مصرف شد. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد از طریق رابطه ذیل محاسبه گردید.

$$\text{DPPH} = \frac{A-B}{B} \times 100$$

A: جذب نمونه، نشان‌دهنده جذب محلول محتوی نمونه و B: جذب بلانک، نشان‌دهنده جذب محلول شاهد حاوی DPPH $1/0$ میلی‌مولار در اتانول ۹۵٪ است.

تعیین متوسط دوز کشنده (LD_{50})

برای بررسی LD_{50} شیره استبرق از موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی $180-200$ گرم (گروه ۱۰ تایی) استفاده شد. عصاره آبی شیره استبرق با دوزهای 250 ، 500 ، 1000 ، 2500 ، ... و 5000 میلی گرم به‌ازای کیلوگرم به صورت گاواز به حیوانات داده شد و میزان مرگ و میر بعد از ۷۲ ساعت اندازه‌گیری گردید (Lorke *et al.*, 1983). نتایج بدست آمده نشان داد که شیره استبرق تا دوز ۳ گرم بر کیلوگرم وزن بدن برای موش بزرگ آزمایشگاهی بی خطر بوده و هیچگونه رفتار و علائم غیرطبیعی در هیچ‌یک از حیوانات در طول دوره درمان توسط شیره استبرق مشاهده نشده است.

مدل حیوانی

در این پژوهش، ۳۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی $180-200$ گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط کنترل شده از نظر میزان نور

(HbA_{1c})، قند خون، تری‌گلیسیرید و کلسترول کل با استفاده از کیت در دستگاه اتوآنالیزرهیتاچی ۹۱۲ انجام گردید.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی تأثیر شیره خشک استبرق و ویتامین C بر فاکتورهای بیوشیمیابی سرم موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ در جدول ۱ ارائه شده است. بررسی‌ها در این تحقیق نشان داد که تک دوز STZ باعث افزایش معنی‌دار در میزان گلوکز خون، تری‌گلیسیرید، کلسترول تام و HbA_{1c} نسبت به گروه کنترل شده است. تیمار موش‌های دیابتی توسط شیره استبرق و همچنین ویتامین C به همراه شیره استبرق باعث کاهش فاکتورهای سرمی ذکر شده نسبت به گروه دیابتی گردید. براساس نتایج نشان داده شده در جدول ۱ میزان تأثیر شیره استبرق بر فاکتورهای سرمی تری‌گلیسیرید، کلسترول تام و گلوکز خون بیشتر از گروه دیابتی تیمار شده توسط شیره استبرق به همراه مکمل HbA_{1c} ویتامین C بوده است. اما نتایج حاصل از بررسی ویتامین C نشان داد که میزان آن در گروه دیابتی تیمار شده توسط شیره استبرق از نظر آماری کاهش قابل توجهی نسبت به گروه دیابتی کنترل داشته است.

در دسیکاتور بیهوش کرده، سپس از منافذ کناری کره چشم با استفاده از لوله‌های مویین که با کل ۷۰٪ ضدغونی گردید خونگیری انجام شد. بدین منظور لوله‌های مویین را با زاویه ۴۵ درجه و به طور مدور از سمت گوشه داخلی چشم، وارد چشم کرده تا اندازه‌ای که به تیغه استخوانی رسیده و ورید خونی پشت آن را پاره نماید. سپس قند خون اندازه‌گیری گردید. در پایان آزمایش نمونه‌ها را با استفاده از کلروفرم در دسیکاتور بیهوش کرده و برای گرفتن نمونه خون، شکم آنها را باز کرده و خون‌گیری از رگ قلب انجام گردید و نمونه خون جمع آوری شد. برای بررسی هموگلوبین گلیکه از لوله حاوی ماده ضد انعقاد استفاده گردید.

تهیه سرم

نمونه خون موش‌های صحرایی در پایان دوره تیمار جمع آوری گردید. سپس با قرار دادن در دمای اتاق اجازه داده شد تا خون لخته شود. آنگاه توسط دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سرم شفاف را جدا کرده و در میکروتیوب‌های درب‌دار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیابی

بررسی فاکتورهای بیوشیمیابی شامل هموگلوبین گلیکه

جدول ۱- بررسی تأثیر شیره استبرق و ویتامین C بر فاکتورهای بیوشیمیابی سرم در موش‌های دیابتی

گروه‌های تیمار	کلسترول تام (mg/dl)	تری‌گلیسیرید (mg/dl)	گلوکز (mg/dl)	(mg/dl) HbA _{1c}
کنترل	۶۷/۸۰±۲/۴۹	۶۴/۲۰±۶/۷۲	۸۴/۸۰±۲۰/۴۱	۲/۱۶±۰/۴۲
شاهد دیابتی	۹۱/۲۰±۲۰/۶۸ ^b	۸۱/۰۰±۶/۹۲ ^b	۴۱۷/۲۰±۱۸/۹۲ ^c	۵/۴۴±۰/۸۰ ^c
دیابتی+شیره استبرق	۷۱/۰۰±۶/۱۶ ^y	۶۴/۶۰±۴/۳۳ ^x	۱۲۵/۸۰±۵۰/۴۴ ^x	۴/۹۴±۰/۳۹ ^{c,x}
دیابتی+شیره استبرق+ویتامین C	۷۲/۰۰±۱۱/۸۹ ^y	۶۵/۶۰±۹/۹۳ ^x	۳۱۰/۸۰±۱۷/۷۶ ^{c,y}	۴/۶۸±۰/۷۱ ^{c,y}
شیره استبرق	۶۹/۰۰±۶/۸۱	۶۳/۴۰±۱۳/۵۰	۸۳/۶۰±۱۸/۹۲	۳/۴۸±۰/۱۴

داده‌ها براساس نرم‌افزار آماری ANOVA و اختلاف آماری توسط LSD انجام گردید و نتایج به صورت میانگین±خطای معیار بیان شده است (N=۵).

^aP<۰/۰۱ و ^bP<۰/۰۰۱ و ^cP<۰/۰۰۱ بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل می‌باشد.

^xP<۰/۰۵ و ^yP<۰/۰۱ بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار و گروه دوم می‌باشد.

در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است که این میزان با تیمار گروه‌های دیابتی توسط شیره استبرق و همچنین ویتامین C به همراه شیره استبرق کاهش معنی‌داری داشته است. نتایج نشان داد که میزان تأثیر شیره استبرق نسبت به گروه چهارم در متعادلسازی شرایط بسیار مؤثرتر بوده است.

براساس نتایج ارائه شده در جدول ۲ وزن بدن موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۱ کاهش چشمگیری از نظر آماری نسبت به گروه کنترل داشته است. از سوی دیگر تیمار گروه‌های دیابتی سوم و چهارم توسط شیره خشک استبرق و همچنین شیره استبرق به همراه مکمل ویتامین C باعث بهبود وزن بدن و افزایش آن در مقایسه با گروه دیابتی شده است. همچنین براساس نتایج بدست آمده میزان مصرف آب

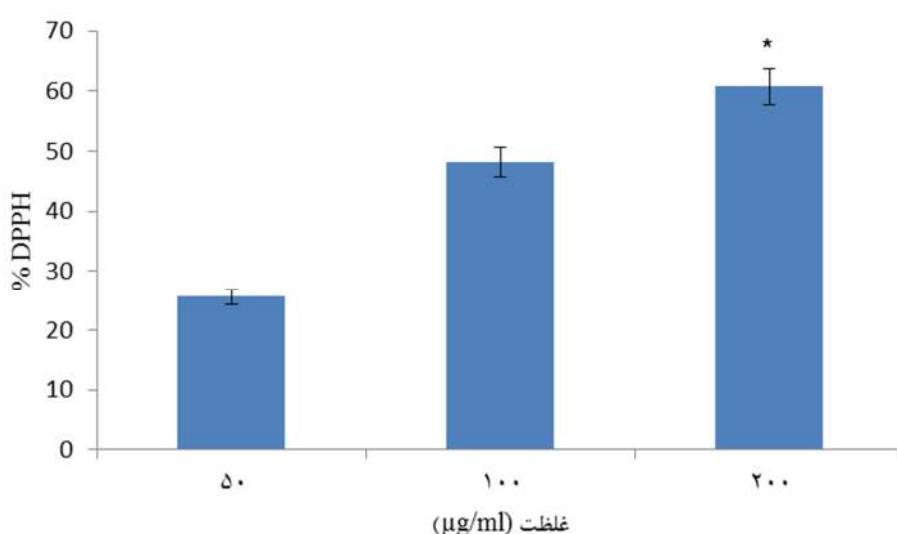
جدول ۲- بررسی تأثیر شیره استبرق و ویتامین C بر میزان آب مصرفی و وزن بدن در موش‌های دیابتی

گروه‌های تیمار	وزن ابتدایی بدن (گرم)	وزن ابتدایی بدن (گرم)	مقدار آب مصرفی (ml/24h)
کنترل	۱۹۱/۸۰±۲۶/۴۷	۲۱۴/۶۰±۲۹/۴۹	۱۲۴±۶۹/۵۸
شاهد دیابتی	۱۹۳/۲۰±۱۶/۶۲	۱۴۷±۶/۷۸ ^c	۲۸۵±۹۹/۳۷ ^c
دیابتی + شیره استبرق	۱۹۰/۸۰±۱۴/۹۳	۱۷۵/۴۰±۱۸/۹۶ ^{b,x}	۲۲۲±۴۳/۲۴
دیابتی + شیره استبرق + ویتامین C	۱۹۲/۶۰±۶/۷۶	۱۶۳/۲۰±۵/۹۷ ^c	۲۵۲±۷۷/۵۸ ^a
Shirere استبرق	۱۹۱±۱۱/۵۳	۲۰۴/۲۰±۲۶/۹۷	۱۴۸±۱۱۷/۵۵
کنترل	۱۹۰/۲۰±۱۸/۶۲	۲۱۱/۸۰±۲۹/۱۹	۱۱۶±۱۰۲/۸۵

داده‌ها براساس نرم‌افزار آماری ANOVA و اختلاف آماری توسط LSD انجام گردید و نتایج به صورت میانگین±خطای معیار بیان شده است (N=5).

b و c P<0.001 بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل می‌باشد.

x P<0.05 بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تیمار و گروه دوم می‌باشد.



شکل ۱- بررسی درصد جذب رادیکال DPPH توسط غلظت‌های متفاوت شیره خشک استبرق

داده‌ها براساس نرم‌افزار آماری ANOVA و اختلاف آماری توسط LSD انجام گردید و نتایج به صورت میانگین±خطای معیار و با سه دوره تکرار انجام شده است. P<0.001 بیانگر اختلاف معنی‌دار بین غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و غلظت‌های دیگر می‌باشد.

در این مطالعه شرایط استرس اکسیداتیو ایجاد شده ناشی از ماده القاء‌کننده دیابت نوع ۱ است. این ماده منجر به تولید انواع رادیکال‌های آزاد و در نتیجه تخریب DNA و نکروز لوزالمعده می‌گردد.

براساس نتایج بدست آمده میزان سطح گلوکز سرمی در گروه دیابتی افزایش معنی‌داری داشته است. دلیل افزایش میزان گلوکز سرمی تخریب سلول‌های بتا در اثر تزریق درون صفاقی STZ به عنوان ماده القاء‌کننده دیابت نوع ۱ می‌باشد. گزارشی نشان داد که میزان سطح گلوکز سرم در موش‌های دیابتی شده توسط STZ افزایش معنی‌داری داشته است که این مطالعه با نتایج بدست آمده از این تحقیق مطابقت می‌کند (Omodanisi *et al.*, 2017).

هیپرگلیسمی در بیماران دیابتی با تولید رادیکال آزاد همراه است که منجر به تخریب بافتی می‌گردد. بنابراین می‌توان دلیل تخریب بافتی ناشی از هیپرگلیسمی را به افزایش بیان گیرنده مربوط به محصولات نهایی روش غیرآنزیمی گلیکوزیلاسیون و فعال‌سازی لیگاندهای مربوطه، افزایش محصولات نهایی روش غیرآنزیمی گلیکوزیلاسیون (AGES)، فعال‌سازی پروتئین کیناز C و افزایش فعالیت مسیر هگزوژامین نسبت داد. نفropاتی، رتینوپاتی و آترواسکلروزیس از بیماری‌های رایج ناشی از عوارض قند خون بالا در بیماران دیابتی می‌باشد (Ceriello, 2003).

یکی از مهمترین روش‌های درمان و کاهش هیپرگلیسمی و عوارض ناشی از آن در بیماران دیابتی تزریق انسولین می‌باشد. از آنجایی که تزریق انسولین برای بیماران دیابتی برای مدت طولانی بسیار آزاردهنده و همراه با عوارض است، بنابراین محققان را بر آن داشته تا روش‌های دیگری را بررسی کنند. یکی از روش‌های مناسب و سنتی در درمان بیماری‌ها، استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد. گیاهان دارویی به دلیل سادگی استفاده از آنها و همچنین نداشتن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای مشابه شیمیایی خود همواره مورد توجه محققان بوده است (Rafieian-Kopaei *et al.*, 2014).

گیاه دارویی استبرق از گیاهان کائوچوبی است که به طور

درصد مهار رادیکال DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی شیره استبرق بررسی شد. نتایج بدست آمده از فعالیت جذب رادیکال‌های DPPH در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج حاصل نشان داد که میزان فعالیت جذب رادیکال DPPH با افزایش غلظت نمونه پس از ۳۰ دقیقه افزایش یافته که در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ به ترتیب برابر با $25/64 \pm 0/0.13$ ، $48/16 \pm 0/0.05$ و $77/40 \pm 0/0.06$ درصد بود.

بحث

دیابت ملیتوس، یکی از مهمترین بیماری‌های اختلال متابولیک مطرح می‌باشد. این بیماری در اثر کاهش ترشح انسولین و یا خود اینمی نسبت به انسولین ایجاد می‌گردد. بر همین اساس دو نوع دیابت شناسایی شده که شامل دیابت نوع ۱ و ۲ می‌باشد (Li *et al.*, 2017). تخریب سلول‌های بتا در دیابت نوع ۱ باعث کمبود و یا فقدان کامل انسولین می‌گردد. افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ کاملاً وابسته به انسولین می‌باشند. در دیابت نوع ۲، ترشح انسولین وجود دارد اما خود اینمی نسبت به آن باعث ایجاد اختلال متابولیکی و دیابت می‌گردد. همچنین رژیم غذایی نادرست و مصرف غذای پرچرب و کم تحرکی منجر به دیابت نوع ۲ بهویژه در افراد مسن می‌گردد (Asmat *et al.*, 2016).

به منظور ایجاد دیابت نوع ۱ در این تحقیق از STZ با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن استفاده گردید. براساس مطالعات انجام شده مواد شیمیایی مانند آلوکسان و استرپتوزوتوسین در ایجاد دیابت نوع ۱ در مدل حیوانی استفاده شده است. محققان با تزریق درون صفاقی تک دوز STZ به موش بزرگ آزمایشگاهی، موفق به ایجاد دیابت نوع ۱ شده‌اند (Wu & Yan, 2015).

استرس اکسیداتیو ناشی از بر هم خوردن تعادل بین سیستم آنتی‌اکسیدانی و اکسیدان در سیستم بیولوژی می‌باشد. رادیکال‌های آزاد عامل اصلی ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و انواع بیماری‌ها می‌باشند (Ames *et al.*, 1993).

می‌رسد که فلاونول موجود در گیاهان دارویی نقش مهمی در مهار رادیکال آزاد و عوارض ناشی از آن دارد. در این تحقیق به بررسی میزان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط شیره استبرق پرداخته شد و نتایج نشان داد که شیره استبرق قادر به مهار رادیکال‌های آزاد است. همچنین گزارش شده است که گیاهان بهدلیل داشتن ترکیب‌های فنلی قادر به مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشند (Amić *et al.*, 2003). محققان نشان دادند که قسمت‌های مختلف گیاه استبرق دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال آزاد است که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (Kenganora *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013).

مطالعات انجام شده توسط Chen و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که فلاونول موجود در گیاه دارویی *Abacopteris penangiana* (Hook) هیپرلیپیدمی در موش‌های دیابتی القاء شده توسط STZ گردید. آنان بیان کردند که تأثیر هیپرگلایسمی و هیپولیپیدمی از اندازه نوکلئترنسکریپشن فاکتور (NFkB) که عامل کنترل سیتوکین‌ها و همچنین فاکتور رشد اندوتیال عروقی (VEGF) است، می‌باشد. مطالعه نشان می‌دهد که افزایش میزان فعالیت NFkB در افراد دیابتی مرتبط با استرس اکسیداتیو ناشی از هیپرگلایسمی می‌باشد (Aragno *et al.*, 2009). گزارشی نشان می‌دهد که افزایش قند خون و ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو منجر به فعال‌سازی پروتئین کیناز C و در نتیجه NFkB می‌شود (Ha *et al.*, 2008). گزارش ارائه شده توسط Neto و همکاران (۲۰۱۳) مبنی بر تأثیر عصاره هیدروالکلی برگ استبرق بر دیابت ایجاد شده توسط ماده استرپتوزوتوبیسین در موش بزرگ آزمایشگاهی نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ استبرق بهدلیل داشتن ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی دارای خواص ضد هیپرگلایسمی است.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که قند خون نه تنها رادیکال‌های آزاد را افزایش می‌دهد بلکه دفاع آنتی‌اکسیدانی

گسترده در مناطق بیابانی، حاره‌ای و نیمه‌حاره‌ای آفریقا، جنوب ایران و شرق افغانستان و پاکستان انتشار دارد. اغلب همه قسمت‌های استبرق دارای خاصیت درمانی است. در گزارشی اثر شیره گیاه استبرق اثرهای آنتی‌اکسیدانی را در برابر قندخون بالا در برابر دیابت ایجاد شده توسط آلوكسان نشان داده است (Rahmatullah *et al.*, 2010). اثر ضد دیابتیک شیره استبرق و همچنین محافظت‌کنندگی در برابر عوامل آسیب‌رسان به سلول‌های بتا، احتملاً بهدلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن بوده و باعث ترمیم سلول‌های بتا و ترشح انسولین و کاهش قند خون می‌شود (Ha & Kim, 1995).

(Fujiwara *et al.*, 1989)

شیره استبرق حاوی انواع متابولیت‌های ثانویه می‌باشد. ترکیب‌های فیتوشیمیایی موجود در شیره شامل آلالکالوئید، استرونول، اسیدهای چرب، استارچ، کربوهیدرات، چربی، تانن، رزین، صمع و تعداد زیادی از پروتئین‌های آنزیمی مانند پروتئاز، کتیناز، لیپاز، پیتیداز، استراز، پراکسیداز، پاپائین و لكتین است (Santos & Van Ree, 2008; Heli *et al.*, 2008). شیره استبرق دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که این خاصیت مربوط به وجود آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند سوبر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون می‌باشد (Kumar *et al.*, 2010).

مطالعات انجام شده نشان داد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی شیره خشک استبرق بهدلیل ترکیب‌های کاردینولید، لیگنین، گلیکوزید و فلاونول‌ها است (Ahmed *et al.*, 2012; Roy *et al.*, 2005). امروزه، افراد زیادی به دنبال مواد مؤثر بر هیپرگلایسمی از گیاهان غنی از فلاونول می‌باشند (Shen *et al.*, 2006; Kawakami *et al.*, 2005). گزارش شده است که فلاونول‌ها قادر به مهار اکسیداسیون LDL به روش‌های مختلفی شامل مهار رادیکال‌های آزاد، کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و کاهش لیپید پراکسیداسیون می‌باشد (Lupattelli *et al.*, 2004). همچنین باعث مهار پاسخ‌های التهابی مربوط به آترواسکلروزیس به عنوان عوارض ناشی از هیپرگلایسمی و هیپرلیپیدمی است (Nagarajan, 2010).

کاهش سطح قند خون، کلسترونول کل و تری‌گلیسیرید می‌شود. همچنین میزان هموگلوبین گلیکه شده توسط شیره استبرق و ویتامین C کاهش داشته است. اما بررسی‌های انجام شده نشان داده که میزان تأثیر شیره استبرق به تنها بیشتر از شیره استبرق و ویتامین C در فاکتورهای بیوشیمیایی قند خون، کلسترونول کل و تری‌گلیسیرید شده است. اما هموگلوبین گلیکه در گروه چهارم نتیجه بهتری نسبت به گروه سوم داشته است. با توجه به نتایج مناسب بدست آمده در این تحقیق پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری در این زمینه انجام گردد تا سازوکار دقیق تأثیر شیره استبرق شناسایی شود. بنابراین می‌توان با توجه به نتایج بدست آمده این گیاه دارویی را در درمان بیماران دیابتی مورد استفاده قرار داد.

سپاسگزاری

نویسنده‌گان سپاس خود را از معاون محترم پژوهشی دانشگاه جیرفت و دانشگاه پیام نور واحد تفت ابراز می‌دارند.

منابع مورد استفاده

- Ahmed, M.K., Saleh, M.E., Sayed, M.E. and Shalaby, K.A.F., 2012. Anti-inflammatory effect of different propolis extracts in thioacetamide-induced hepatotoxicity in male rat. *Journal of Basic Applied Sciences*, 6: 29-40.
- Alrheam, A.I.A.A. and Saad-Al Shehri, Z., 2015. Ethanopharmacological study of the aqueous, chloroform, ethanol leaves extracts and latex of *Calotropis procera* in diabetic rats. *Biomedical Research and Therapy*, 2(11): 396-401.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceeding of the National Academy Sciences*, 90(17): 7915-7922.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D. and Trinajstić, N., 2003. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica chemica acta*, Hrvatsko Kemijsko Društvo, 76(1): 55-61.
- Aragno, M., Meineri, G., Vercellinatto, I., Bardini, P., Raimondo, S., Peiretti, P.G., Vercelli, A., Alloatti,

را مختل می‌کند. کودکان مبتلا به دیابت نوع ۱ شواهدی دال بر افزایش استرس اکسیداتیو در خون داشته و همچنین کاهش در دفاع آنتی‌اکسیدانی، از جمله کاهش سطح ویتامین C، گلوتاتیون، کاهش سطح سوپر اکسید دیسموتاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در آنها مشاهده شده است. در این مطالعه تیمار موسهای دیابتی توسط شیره استبرق باعث کاهش سطح گلوکز و همچنین کلسترونول و تری‌گلیسیرید شده که آن را می‌توان حاصل از تأثیر فلاونول موجود در شیره استبرق دانست.

آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله ویتامین C می‌توانند سلول‌های بتا را در برابر سمیت استرس اکسیداتیو محافظت کنند. جذب سلولی ویتامین C باعث ترویج انسولین و مهار قندخون می‌شود. ویتامین C سمیت گلوکز را کاهش می‌دهد و به افزایش محتوای انسولین کمک می‌کند. ویتامین C از طریق بهبود در متابولیسم غیراکسیداتیو گلوکز به بهبود عملکرد انسولین در افراد دیابتی کمک می‌کند (Dakhale *et al.*, 2011). اسکوربیک اسید از نظر ساختاری با گلوکز مشابه است. بنابراین در فرایند گلیکوزیلاسیون غیر آنزیمی آنها رقابت می‌کند، در نتیجه از گلیکه شدن هموگلوبین جلوگیری کرده و در نتیجه از تشکیل محصولات نهایی این واکنش می‌کاهد. از سوی دیگر با تقویت سیستم آنتی‌اکسیدان باعث مهار رادیکال آزاد می‌گردد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده که میزان HbA_{1c} در گروه دیابتی که توسط شیره استبرق به همراه ویتامین C تیمار شده‌اند تأثیر بیشتری نسبت به گروه دیابتی که تنها با شیره استبرق تیمار شده‌اند، داشته است.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی، با توجه به تحقیقات و مطالعات انجام شده در مورد تأثیر گیاه استبرق و دیابت و همچنین بررسی‌های انجام شده در این مطالعه می‌توان گفت که شیره گیاه استبرق به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه مهمی مانند فلاونول‌ها و همچنین خواص آنتی‌اکسیدان بالای آن قادر به مهار رادیکال‌های آزاد و در نتیجه ترمیم و بازسازی سلول‌های بتا باقیمانده و ترشح بیشتر انسولین می‌گردد. در نتیجه تیمار موسهای توسط شیره استبرق و ویتامین C باعث

- HDL2 cholesterol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 60(1): 100-105.
- Heli, H., Amani, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Jabbari, A., Floris, G. and Mura, A., 2008. Electroactive centers in *Euphorbia* latex and lentil seedling amine oxidases. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 72(1): 29-36.
 - Hillstrom, R.J., Yacapin-Ammons, A.K. and Lynch, S.M., 2003. Vitamin C inhibits lipid oxidation in human HDL. *Journal of Nutrition*, 133(10): 3047-3051.
 - Iwata, N., Okazaki, M., Xuan, M., Kamiuchi, S., Matsuzaki, H. and Hibino, Y., 2014. Orally administrated ascorbic acid suppresses neuronal damage and modifies expression of SVCT2 and GLUT1 in the brain of diabetic rats with cerebral ischemia-reperfusion. *Nutrition*, 6(4): 1554-1577.
 - Kawakami, Y., Tsurugasaki, W., Nakamura, S. and Osada, K., 2005. Comparison of regulative functions between dietary soy isoflavones aglycone and glucoside on lipid metabolism in rats fed cholesterol. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(4): 205-212.
 - Kenganora, M., Bhaskaran, M., Santhepeete, M.N. and Hukkeri, V.I., 2017. Antioxidant potential of a toxic plant *Calotropis procera*. *Free Radicals and Antioxidants*, 7(2): 143-151.
 - Kumar, G., Karthik, L. and Rao, K.V.B., 2010. Antibacterial activity of aqueous extract of *Calotropis gigantea* leaves-an in vitro study. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review Research*, 4(2): 141-144.
 - Kumar, S., Gupta, A. and Pandey, A.K., 2013. *Calotropis procera* root extract has the capability to combat free radical mediated damage. Hindawi Publishing Corporation, 2013: 1-8.
 - Li, C., Miao, X., Li, F., Wang, S., Liu, Q., Wang, Y. and Sun, J., 2017. Oxidative stress-related mechanisms and antioxidant therapy in diabetic retinopathy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 1-15.
 - Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8): 118-126.
 - Lorke, D., 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 54(4): 275-287.
 - Lupattelli, G., Marchesi, S., Lombardini, R., Roscini, A.R., Trinca, F., Gemelli, F., Vaudo, G. and Mannarino, E., 2004. Artichoke juice improves endothelial function in hyperlipidemia. *Life Sciences*, 76(7): 775-782.
 - Tomasinelli, C.E. and Danni, O., 2009. Cardiac impairment in rabbits fed a high-fat diet is counteracted by dehydroepiandrosterone supplementation. *Life Science*, 85(1): 77-84.
 - Asmat, U., Abad, K. and Ismail, K., 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress-a concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5): 547-553.
 - Ceriello, A., 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*, 26(5): 1589-1596.
 - Chen, J., Chen, X., Lei, Y., Wei, H., Xiong, C., Liu, Y., Fu, W. and Ruan, J., 2011. Vascular protective potential of the total flavanol glycosides from *Abacopteris penangiana* via modulating nuclear transcription factor- κ B signaling pathway and oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(1): 217-223.
 - Dakhale, G.N., Chaudhari, H.V. and Shrivastava, M., 2011. Supplementation of vitamin C reduces blood glucose and improves glycosylated hemoglobin in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind study. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2011: 1-5.
 - Dimova, R., Tankova, T., Guerguelcheva, V., Tournev, I., Chakarova, N., Grozeva, G. and Dakovska, L., 2017. Risk factors for autonomic and somatic nerve dysfunction in different stages of glucose tolerance. *Journal of Diabetes and its Complications*, 31(3): 537-543.
 - Fraga, C.G., Gallego, M., Verstraeten, S.V. and Oteiza, P.I., 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6): 435-445.
 - Fujiwara, Y., Kondo, T., Murakami, K. and Kawakami, Y., 1989. Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathione-dependent system in erythrocytes of non-insulin dependent diabetics. *Journal of Molecular Medicine*, 67(6): 336-341.
 - Gajdosik, A., Gajdosikova, A., Stefk, M., Navarova, J. and Hozova, R., 1999. Streptozotocin-induced experimental diabetes in male Wistar rats. *General Physiology and Biophysics*, 18: 54-62.
 - Ha, H. and Kim, K.H., 1995. Role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Kidney International*, 51: S18-21.
 - Ha, H., Hwang, I.A., Park, J.H. and Lee, H.B., 2008. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82: S42-S45.
 - Hallfrisch, J., Singh, V.N., Muller, D.C., Baldwin, H., Bannon, M.E. and Andres, R., 1994. High plasma vitamin C associated with high plasma HDL-and

- 102(3): 470-473.
- Santos, A. and Van Ree, R., 2011. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens?. International Archives of Allergy and Immunology, 155(3): 191-204.
 - Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R. and Roy, P., 2008. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. Food Chemistry, 110(3): 697-705.
 - Shen, J., White, M., Husband, A.J., Hambly, B.D. and Bao, S., 2006. Phytoestrogen derivatives differentially inhibit arterial neointimal proliferation in a mouse model. European Journal of Pharmacology, 548(1): 123-128.
 - Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 945-948.
 - Wang, P., Su, Z., Yuan, W., Deng, G. and Li, S., 2012. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Eryngium* L. (Apiaceae). Pharmaceutical Crops, 3: 99-120.
 - Wu, J. and Yan, L.J., 2015. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. Diabetes Metabolic Syndromes and Obesity, 8: 181-188.
 - Zhang, X. and Tan, B.K., 2000. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of andrographis paniculata in normal and diabetic rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 27(5-6): 358-363.
 - Nagarajan, S., 2010. Mechanisms of anti-atherosclerotic functions of soy-based diets. The Journal of Nutritional Biochemistry, 21(4): 255-260.
 - Neto, L., Mário, C., de Vasconcelos, C.F., Thijan, V.N., Caldas, G.F., Araújo, A.V. and Wanderley, A.G., 2013. Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. Revista Brasileira de Farmacognosia, 23(6): 913-919.
 - Omodanisi, E.I., Aboua, Y.G. and Oguntibeju, O.O., 2017. Assessment of the anti-hyperglycaemic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol extract of *Moringa oleifera* in diabetes-induced nephrotoxic male wistar rats. Molecules, 22(439): 1-16.
 - Padhy, B.M., Srivastava, A. and Kumar, V.L., 2007. *Calotropis procera* latex affords protection against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. Journal of Ethnopharmacology, 113(3): 498-502.
 - Rafieian-Kopaei, M., Hosseini, M. and Shirzad, H., 2014. Comment on: effect of pomegranate flower extract on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Nephropathology, 3(4): 121-123.
 - Rahmatullah, M., Sultan, S., Toma, T., Lucky, S., Chowdhury, M., Haque, W., Annay, E. and Jahan, R., 2010. Effect of *Cuscuta reflexa* stem and *Calotropis procera* leaf extracts on glucose tolerance in glucose-induced hyperglycemic rats and mice. African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines, 7(2): 109-112.
 - Roy, S., Sehgal, R., Padhy, B.M. and Kumar, V.L., 2005. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. Journal of Ethnopharmacology,

Simultaneous effects of *Calotropis procera* (Willd.) R. Br. dried latex and vitamin C on the serum factors of type 1 diabetic rats

F. Molahinejad¹, F. Ezzati Ghadi^{2*}, A. Ramezani Ghara³ and S. Rezaei Zarchi⁴

1- M.Sc. student of Biochemistry, Payam-e-Noor University of Taft, Yazd, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, University of Jiroft, Jiroft, Iran

E-mail: fezzatighadi@yahoo.com; f.ezzati@ujiroft.ac.ir

3- Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, University of Jiroft, Jiroft, Iran

4- Department of Biology, Faculty of Sciences, Payam-e-Noor University of Taft, Yazd, Iran

Received: November 2017

Revised: June 2018

Accepted: September 2018

Abstract

The present study investigates the anti-diabetic properties of dried latex of *Calotropis procera* (Willd.) R. Br. with vitamin C in diabetic rats. Thirty adult male Wistar rats were randomly and equally divided into six groups as follow: first group) control, second group) diabetes was induced by a single dose of streptozotocin (50 mg/kg b.w by IP), third group) diabetic rats were treated by 200 mg dried latex per kilogram of body weight, fourth group) the diabetic rats were treated by combined treatments of dried latex (200mg/kg) and vitamin C (100mg/kg) by gavage, fifth group) animals in this group were treated by (200mg/kg) dried latex daily and the sixth group) rats were treated by vitamin C (100mg/kg). After 15 days, the biochemical factors of blood sugar, triglyceride, total cholesterol, and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) were evaluated. Results showed that the amount of biochemical factors was increased significantly in the diabetic group. Dried latex and also the combined treatment of dried latex and vitamin C reduced the elevated levels of abovementioned biochemical factors. Moreover, the aqueous extract of dried latex compared to the group four, was more effective. In conclusion, the dried latex of *Calotropis procera* has anti-diabetic activity.

Keywords: Hyperglycemy, hyperlipidemy, *Calotropis procera* (Willd.) R. Br., vitamin C.