Research Article

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research

DOI: 10.22092/ijmapr.2026.368313.3513

Vol. 42, No. 2, Page 271-283 (2026)

Effects of hydroalcoholic extract of *Pistacia atlantica* Desf. fruit on glycosylated hemoglobin formation in dogs under in vitro conditions

Seyyedeh Maryam Zamanian Dehkordi[1*], Mohsen Jafarian Dehkordi[2], Mohammad Zavarshani[3], Mohsen Asgari[4] and Maryam Zavarshani[5]

1*. Corresponding author, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, E-mail: maryamzamanian97@gmail.com
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
4. Department of Basic Sciences, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran
5. PhD student in Microbiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, Iran

Received: 16/01/2025 Revised: 03/07/2026 Accepted: 07/07/2026

Abstract

Background and objectives: Prolonged elevation of blood glucose levels (hyperglycemia) increases the occurrence of the non-enzymatic Maillard reaction. This process results in the formation of glycated proteins, including glycated hemoglobin (HbA1c), whose levels increase under diabetic conditions. Several studies have shown that serious secondary complications of diabetes, including cardiovascular diseases and chronic kidney damage, are associated with elevated HbA1c levels. Therefore, reducing HbA1c levels may help prevent or manage diabetes-related complications. In recent years, studies have demonstrated that medicinal plants can reduce HbA1c formation. Because diabetes is one of the most common metabolic disorders in dogs, this study aimed to evaluate the effect of *Pistacia atlantica* Desf. hydroalcoholic extract on hemoglobin glycation in hemoglobin isolated from dogs under in vitro conditions.

Methodology: Initially, 20 mL of blood was collected from a clinically healthy dog with normal fasting blood glucose levels, and hemoglobin was isolated from the blood sample. To prepare the hydroalcoholic extract, fruits of *Pistacia atlantica* Desf. were collected from mountainous regions of Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran. The fruits were air-dried at room temperature and subsequently extracted using a hydroalcoholic solvent consisting of an ethanol–water mixture. The resulting hydroalcoholic extract was prepared at concentrations of 0.1, 0.5, and 1 g/dL. Glucose solutions at 20 and 40 mmol/L were also prepared to simulate hyperglycemic conditions. Experimental mixtures containing hemoglobin, glucose, and the designated concentrations of the hydroalcoholic extract were prepared and incubated at 37 °C in the dark for 7 and 14 days. Following incubation, HbA1c levels were determined using a colorimetric assay. Data were analyzed using SPSS software (version 26). Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. Differences among groups were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc multiple-comparison test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results: On day 7 under 20 mM glucose (hyperglycemic) conditions, HbA1c levels in the positive

Copyright: © 2026 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

control and the 0.1, 0.5, and 1 g/dL *Pistacia atlantica* extract groups were 9.67 ± 0.141, 8.68 ± 0.021, 9.16 ± 0.212, and 9.40 ± 0.141, respectively. On day 14, HbA1c levels in the same groups were 9.72 ± 0.141, 7.32 ± 0.021, 7.58 ± 0.002, and 8.21 ± 0.002, respectively. Statistical analysis indicated that HbA1c formation was significantly lower in all extract-treated groups than in the positive control group ($P < 0.05$). Similarly, under 40 mM glucose conditions, HbA1c levels on day 7 in the positive control and the 0.1, 0.5, and 1 g/dL extract groups were 18.42 ± 0.593, 17.07 ± 0.070, 17.58 ± 0.353, and 17.63 ± 0.123, respectively. On day 14, the corresponding values were 18.53 ± 0.141, 15.40 ± 0.067, 15.19 ± 0.124, and 16.86 ± 0.125, respectively. Statistical analysis also revealed a significant reduction in HbA1c formation in all extract-treated groups compared with the positive control group ($P < 0.05$).

Conclusion: The results indicate that the *Pistacia atlantica* fruit extract exhibits anti-glycation activity and inhibits HbA1c formation under hyperglycemic conditions. Therefore, *Pistacia atlantica* fruit extract may have potential as a therapeutic adjunct for reducing HbA1c levels and, consequently, mitigating secondary complications associated with hyperglycemia and diabetes in dogs.

Keywords: In vitro, colorimetric, hyperglycemia, hemoglobin, *Pistacia atlantica* Desf.

بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی میوه گیاه بنه کوهی (*Pistacia atlantica* Desf.) بر میزان تشکیل هموگلوبین گلیکوزیله شده در سگ در شرایط برون‌تنی

سیده مریم زمانیان دهکردی*[۱]، محسن جعفریان دهکردی[۲]، محمد زوارشانی[۳]، محسن عسگری[۴] و مریم زوارشانی[۵]

۱*- نویسنده مسئول، دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

پست‌الکترونیک: maryamzamanian97@gmail.com

۲- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- دکتری تخصصی باکتری‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- دانشجوی کارشناسی ژنتیک، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

۵- دانشجوی دکتری تخصصی میکروب‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۷ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۱۶

چکیده

سابقه و هدف: افزایش طولانی‌مدت قند خون (هایپرگلیسمی)، منجر به افزایش بروز واکنش غیر آنزیمی میلارد می‌گردد. در نتیجه این واکنش، تولید پروتئین‌های قنددار شده یا گلایکه شده مانند هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c)، افزایش می‌یابد. مطالعات مختلف نشان می‌دهند عوارض ثانویه جدی بیماری دیابت مانند مشکلات قلبی-عروقی و آسیب‌های مزمن کلیوی به‌دنبال افزایش HbA1c رخ می‌دهد. ازاین‌رو، کاهش تولید HbA1c منجر به کنترل عوارض در موارد ابتلا می‌گردد. امروزه اثبات شده است گیاهان دارویی می‌توانند منجر به کاهش میزان تولید HbA1c گردند. با توجه به اینکه بیماری دیابت یکی از شایع‌ترین انواع بیماری‌های متابولیک در سگ‌ها می‌باشد، این مطالعه با هدف ارزیابی تأثیر عصاره هیدروالکلی میوه گیاه بنه کوهی بر میزان قنددار شدن هموگلوبین جدا شده از سگ در شرایط برون‌تنی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: ابتدا از یک قلاده سگ سالم و فاقد علائم (پس از اندازه‌گیری قند خون ناشتا) ۲۰ میلی‌لیتر خون گرفته و هموگلوبین آن جدا شد. به‌منظور تهیه عصاره هیدروالکلی بنه کوهی، ابتدا میوه درخت بنه کوهی از نواحی کوهستانی استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید. سپس گیاه به‌دست آمده در دمای اتاق خشک گردید. در مرحله بعدی با استفاده از آب و اتانول، عصاره‌گیری انجام شد. سپس غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی بنه کوهی تهیه شد. همچنین محلول گلوکز در دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار (به‌منظور شبیه‌سازی شرایط هایپرگلیسمیک) تهیه گردید. در نهایت نمونه‌های نهایی متشکل از هموگلوبین، گلوکز و غلظت‌های مذکور عصاره هیدروالکلی تهیه و به‌مدت ۷ و ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی انکوبه گردیدند. پس از پایان انکوباسیون، میزان HbA1c نمونه‌ها با استفاده از روش کلریمتریک اندازه‌گیری شد. داده‌ها پس از بررسی نرمال بودن توزیع با آزمون Shapiro–Wilk، با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ تجزیه‌وتحلیل شدند و سطح معنی‌داری آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج: براساس نتایج به‌دست آمده در روز هفت و شرایط هایپرگلیسمیک ۲۰ میلی‌مولار گلوکز، میزان هموگلوبین A1c در گروه‌های کنترل مثبت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر عصاره هیدروالکلی بنه کوهی به ترتیب ۰/۱۴۱ ± ۹/۶۷، ۰/۰۲۱ ± ۸/۶۸، ۰/۲۱۲ ± ۹/۱۶ و ۰/۱۴۱ ± ۹/۴۰ بود. همچنین در روز چهارده و همین شرایط هایپرگلیسمیک، میزان هموگلوبین A1c در گروه‌های کنترل مثبت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی بنه کوهی به ترتیب ۰/۱۴۱ ± ۹/۷۲، ۰/۰۲۱ ± ۷/۳۲، ۰/۰۰۲ ± ۷/۵۸ و ۰/۰۰۲ ± ۸/۲۱ بود. تحلیل آماری نتایج مذکور نشان داد که میزان تشکیل هموگلوبین A1c در گروه‌های مختلف عصاره هیدروالکلی بنه کوهی در مقایسه با گروه کنترل مثبت به صورت معنی‌دار کاهش یافته است ($P < 0.05$). همچنین در

روز هفت و شرایط هایپرگلیسمیک ۴۰ میلی‌مولار گلوکز، میزان هموگلوبین A1c در گروه‌های کنترل مثبت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی بنه کوهی به‌ترتیب ۰/۵۹۳ ± ۱۸/۴۲، ۰/۰۷۰ ± ۱۷/۰۷، ۰/۳۵۳ ± ۱۷/۵۸ و ۰/۱۲۳ ± ۱۷/۶۳ بود. در روز چهارده نیز میزان هموگلوبین A1c در گروه‌های کنترل مثبت و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر از عصاره به‌ترتیب ۰/۱۴۱ ± ۱۸/۵۳، ۰/۰۶۷ ± ۱۵/۴۰، ۰/۱۲۴ ± ۱۵/۱۹ و ۰/۱۲۵ ± ۱۶/۸۶ بود. تحلیل آماری نتایج حکایت از کاهش معنی‌دار میزان تشکیل هموگلوبین A1c در گروه‌های مختلف عصاره هیدروالکلی بنه کوهی در مقایسه با گروه کنترل مثبت داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، میوه گیاه بنه کوهی دارای خواص تقلیل‌دهندگی تشکیل هموگلوبین A1c، در شرایط هایپرگلیسمیک می‌باشد. ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد از عصاره این گیاه بتوان به عنوان مکمل درمان به‌منظور کاهش تولید هموگلوبین A1c و کاهش عوارض ثانویه در موارد افزایش قند خون، مانند بیماری دیابت، در سگ استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: برون‌تنی، بنه کوهی، کلریمتریک، هایپرگلیسمی، هموگلوبین.

مقدمه

دیابت در سگ‌ها یک بیماری غدد درون‌ریز است که از علائم آن می‌توان به پرخوری، پرنوشی، افزایش حجم و دفعات دفع ادرار، امکان کاتاراکت، استفراغ، کاهش وزن و تنفس بد بوی ناشی از تجمع کتون و از یافته‌های آزمایشگاهی می‌توان به افزایش قند خون و قند در ادرار اشاره کرد. این بیماری زمانی رخ می‌دهد که بدن نتواند انسولین کافی تولید و یا اینکه نتواند به‌درستی از انسولین تولید شده استفاده نماید (Parker & Hill, 2023). دلایل مختلفی وجود دارد که می‌تواند منجر به بروز بیماری دیابت در سگ‌ها گردد. ازجمله بیماری خود ایمنی که در آن سیستم ایمنی سگ به سلول‌های پانکراس حمله کرده و در نهایت میزبان توانایی تولید انسولین را از دست داده و دیابت نوع ۱ ایجاد می‌گردد. التهاب پانکراس (پانکراتیت) از دلایل دیگر ایجاد کننده دیابت در سگ‌ها است (Suemanotham *et al.*, 2023). دیابت همچنین می‌تواند در برخی نژادها ازجمله اسکیمو آمریکایی، داشهوند و لابرادور رتریور با احتمال بیشتری رخ دهد (Davison, 2023).

به نظر می‌رسد عوارض طولانی‌مدت دیابت در نتیجه تجمع ماکرومولکول‌های بافتی تغییر یافته توسط واکنش گلایکه شدن غیر آنزیمی میلارد باشد. واکنش میلارد بر اثر اتصال گروه کربونیل قند احیاکننده به گروه آمین پروتئین‌ها ایجاد می‌شود. گلیکاسیون پروتئین یکی از تغییرات پس از ترجمه‌ای است و پروتئین گلایکه شده متحمل واکنش‌های دیگری مانند بازآرایی و تراکم شده و در نهایت به محصولات پیچیده‌تری که دارای نشر فلوئورسانس هستند تبدیل می‌گردد. به مشتقات اخیر تولید شده، محصولات نهایی گلایکه شدن (Advanced Glycation End products, AGEs) گفته می‌شود که می‌توانند خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌ها را تغییر داده و از این طریق عملکرد آنها را تحت تأثیر قرار دهند (Sourris *et al.*, 2021). بنابراین جلوگیری از تشکیل آنها در کنترل عوارض دیابت در سگ‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

به‌دنبال افزایش گلوکز در پلاسما، با استفاده از سازوکار انتشار تسهیل شده گلوکز به داخل گلبول قرمز نفوذ کرده، در نتیجه یکی از انواع پروتئین‌های گلایکه شده تحت عنوان هموگلوبین گلیکوزیله شده (HbA1c) تولید می‌گردد. در جریان بروز دیابت و حتی در مرحله پیش دیابت بروز واکنش میلارد و افزایش میزان HbA1c به‌طور آهسته و غیرقابل برگشت در طول ۱۲۰ روز عمر گلبول قرمز رخ می‌دهد (Jia *et al.*, 2023). ازاین‌رو، اندازه‌گیری میزان این فاکتور در خون شاخص بسیار مناسبی برای تشخیص دیابت در سگ‌هاست، زیرا در افزایش موقت قند خون (هایپرگلیسمی) این پروتئین افزایش نمی‌یابد و ارزیابی عوارض ناشی از بیماری می‌باشد. بنابراین اتخاذ راهبردهای مختلف در جهت کاهش میزان تولید HbA1c و متعاقب آن کاهش عوارض ناشی از بیماری از

اهمیت بالایی برخوردار است.

در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور کاهش تولید پروتئین‌های گلایکه شده، به‌طور چشمگیری مورد توجه محققان قرار گرفته است. گیاهان حاوی مجموعه پیچیده‌ای از ترکیبات دارویی و آنتی اکسیدانی می‌باشند که حتی داروسازی مدرن امروزی نیز قادر به تولید مشابه آن نمی‌باشد (Yousof Ali *et al.*, 2021). از سویی، در مقایسه با ترکیبات شیمیایی سنتزی، دارای عوارض کمتر و در عین حال اثربخشی مناسبی هستند. مطالعات مختلف خواص آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتی گیاهان دارویی مختلف را به اثبات رسانیده است. اما مطالعه مستقیم تأثیر یک عصاره بر روی هموگلوبین در شرایط برون‌تنی محدود و اغلب موارد این مطالعات بر روی هموگلوبین با منشأ انسان انجام شده است. برای نمونه، در مطالعه (Karimabad *et al.*, 2020) اثرهای مشخص و معنادار هندوانه ابوجهل در کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c در شرایط برون‌تنی در انسان گزارش گردیده است. همچنین تأثیر کاهنده عصاره‌های هیدروالکلی گل‌سرخ و شوید بر میزان تولید هموگلوبین A1c در مطالعه (Soleimani & Shahanipour, 2017) اثبات شده است. اما در مورد تأثیر گیاهان دارویی بر کاهش تشکیل هموگلوبین A1c در سگ مطالعات بسیار محدود و در شرایط درون‌تنی انجام شده است. در نمونه‌ای از این قبیل مطالعات، اثرهای مثبت آشواگاندا و هلیله سیاه در کاهش تشکیل هموگلوبین A1c در سگ در شرایط درون‌تنی گزارش گردیده است (Devi *et al.*, 2023). ازاین‌رو، با توجه به مطالعات بسیار اندک انجام شده در گذشته و ظرفیت درمانی اثبات شده بسیاری از گیاهان دارویی در پستانداران دیگر مانند انسان و رت، تأثیر گیاه بنه کوهی بر کاهش تشکیل هموگلوبین A1c در سگ بررسی شد.

بنه کوهی یا پسته کوهی از جنس پسته با نام علمی *Pistacia atlantica* یکی از درختان بومی ایران می‌باشد که در ارتفاعات رشته کوه زاگرس و مناطق کوهستانی در شرق کشور، به فراوانی یافت می‌شود. این میوه کوچک طبع گرم و خشک دارد. میوه درخت پسته کوهی به دلیل ترکیبات و ویتامین‌های مؤثری که دارد، برای درمان انواع بیماری‌ها به‌ویژه بیماری‌های التهابی مانند روماتوئید و دردهای مفصلی مفید است. همچنین مطالعاتی بر روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره بنه کوهی انجام شده است که نتایج به‌دست آمده حکایت از تأثیر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه آن دارد (Memariani *et al.*, 2024). ازاین‌رو، با توجه به موارد مذکور و اهمیت لزوم شناسایی ترکیبات جدید، به‌ویژه ترکیبات گیاهی به عنوان مکمل و یا حتی جایگزین درمان و پیشگیری از بیماری دیابت در حیوانات خانگی مانند شناسایی ترکیبات کاهنده تولید HbA1c، این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره هیدروالکلی میوه بنه کوهی بر میزان تشکیل هموگلوبین گلایکه شده در حالت برون‌تنی در سگ طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

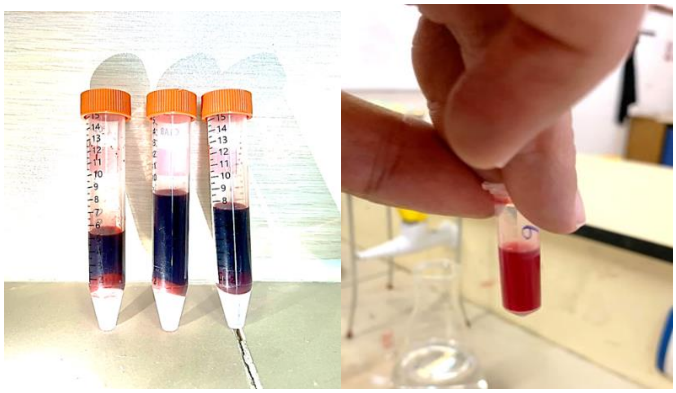
تهیه عصاره هیدروالکلی بنه کوهی

میوه درخت بنه کوهی از نواحی کوهستانی استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از بررسی و تأیید توسط مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان چهارمحال و بختیاری (کد هرباریوم: D-7400)، به مجتمع آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل گردیدند. به‌منظور تهیه عصاره هیدروالکلی بنه کوهی، ۲۰۰ گرم میوه بنه کوهی تازه تهیه شده پس از شستشو در دمای اتاق خشک و بعد آسیاب گردید. در مرحله بعدی مقدار ۱۰۰ گرم از پودر به‌دست آمده توزین شد و با ۴۰۰ میلی‌لیتر از مخلوط آب و اتانول به نسبت ۱ به ۳ به مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه و بر روی شیکر انکوبه گردید. پس از این مدت، محتویات داخل ظرف به‌وسیله کاغذ صافی و قیف شیشه‌ای صاف شد. سپس محلول حاصل به پتری‌دیش‌های استریل آزمایشگاهی منتقل گردید و درون فریز درایر در برودت ۵۰- درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلأ قرار داده شد تا به‌طور کامل خشک گردد. در نهایت با استفاده از کاردک‌های استریل پودر حاصل از کف ظروف جدا شد و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵

و ۱ گرم بر دسی‌لیتر عصاره با استفاده از آب مقطر استریل تهیه گردید.

جداسازی هموگلوبین از خون سگ

به‌منظور انجام این مطالعه، مجوز لازم از کمیته تخصصی اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به شماره IR.IAU.SHK.REC.1403.096 اخذ گردید. در این مطالعه از یک قلاده سگ نر بالغ دو ساله با نژاد میکس و وزن تقریبی ۲۰ کیلوگرم که در بخش حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد نگهداری می‌شد، استفاده گردید. پس از اندازه‌گیری قند خون ناشتا با استفاده از دستگاه گلوکومتر (CERA-PET, Korea) و تأیید سالم بودن حیوان توسط دامپزشک، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر خون اخذ شد. از لوله‌های خون‌گیری مخصوص آزمایش CBC و حاوی ماده ضد انعقاد EDTA برای نگه‌داری نمونه خون استفاده گردید. سپس نمونه خون اخذ شده به لوله‌های فالکون منتقل گردیده و یک نوبت به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. در مرحله بعد، بخش رویی محصول که شامل پلاسما بود با استفاده از سمپلر خارج و هم حجم نمونه خون درون لوله‌ها سرم فیزیولوژی اضافه گردید. سپس نمونه‌ها با حرکت دست چندین نوبت مخلوط شده و دوباره در شرایط مذکور سانتریفوژ گردیدند. این مرحله ۵ نوبت تا زمان شستشوی کامل گلبول‌های قرمز تکرار گردید. در مرحله بعدی حجم گلبول‌های قرمز شسته شده داخل لوله‌ها تعیین شد و ۲ برابر حجم آن بافر فسفات ۰/۰۱ مولار (Sigma-Aldrich, USA) و نیم برابر حجم آن تترا کلراید کربن (CCL4) (Merck, Germany) به لوله‌ها اضافه گردید. سپس لوله‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه و در نهایت به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۲۵۰۰ دور سانتریفوژ گردیدند. پس از این مرحله، محلول شفاف رویی از اجزای لیز شده گلبول‌های قرمز جداسازی گردید (Fattahpour *et al.*, 2015). بخش اخیر شامل هموگلوبین جدا شده از همولیزات بود که به اختصار هموگلوبین نامیده می‌شود و برای انجام مراحل بعدی آزمایش استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱- نمونه همولیزات (هموگلوبین) تهیه شده از خون سگ

Figure 1. Hemolysate (hemoglobin) sample prepared from dog blood

ایجاد شرایط هایپرگلیسمیک (افزایش قند خون)

با استفاده از پودر D-گلوکز (Sigma-Aldrich, USA)، غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار گلوکز به‌منظور شبیه‌سازی شرایط هایپرگلیسمیک تهیه شد.

بررسی تأثیرگذاری عصاره

مطابق جدول شماره یک، گروه‌های مختلف مطالعه با استفاده از میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتر و غلظت‌های مشخص عصاره، گلوکز و هموگلوبین، آماده‌سازی گردیدند. به‌منظور افزایش صحت و دقت سنجش تأثیرگذاری، تمامی گروه‌ها با

دو تکرار تهیه شدند. همچنین به‌منظور پیشگیری از آلودگی نمونه‌ها، ۵۰ میکرولیتر جنتامایسین (Sigma-Aldrich, USA) ۰/۰۱ مولار اضافه گردید (Ghafouri-Khosrowshahi *et al.*, 2007). پس از آماده‌سازی گروه‌های مطالعه، میکروتیوپ‌های حاوی محلول‌های مذکور به مدت ۷ و ۱۴ روز در شرایط تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند.

جدول ۱- روش آماده‌سازی گروه‌های درمانی و کنترل

Table 1. Method of preparing treatment and control groups

GROUP	GLUCOSE	HYDROALCHOLIC EXTRACT	HEMOGLOBIN
TREATMENT GROUP	500 μL, 40 mmol.L^{-1}	500 μL, 0.1 g.dL^{-1}	500 μL
TREATMENT GROUP	500 μL, 40 mmol.L^{-1}	500 μL, 0.5 g.dL^{-1}	500 μL
TREATMENT GROUP	500 μL, 40 mmol.L^{-1}	500 μL, 1 g.dL^{-1}	500 μL
POSITIVE CONTROL GROUP	500 μL, 40 mmol.L^{-1}	-	500 μL
NEGATIVE CONTROL GROUP	-	-	500 μL
TREATMENT GROUP	500 μL, 20 mmol.L^{-1}	500 μL, 0.1 g.dL^{-1}	500 μL
TREATMENT GROUP	500 μL, 20 mmol.L^{-1}	500 μL, 0.5 g.dL^{-1}	500 μL
TREATMENT GROUP	500 μL, 20 mmol.L^{-1}	500 μL, 1 g.dL^{-1}	500 μL
POSITIVE CONTROL GROUP	500 μL, 20 mmol.L^{-1}	-	500 μL
NEGATIVE CONTROL GROUP	-	-	500 μL

اندازه‌گیری هموگلوبین گلایکه شده (HbA1c)

به‌منظور اندازه‌گیری هموگلوبین گلایکه شده از کیت شرکت مهسایاران (تهران، ایران) استفاده گردید. اصول انجام آزمایش با استفاده از کیت مذکور کلریمتریک بود. این روش برای نخستین بار از سوی فلوکیگر و وینترهالتر مورد استفاده قرار گرفت. بعدها برای تسهیل در روند انجام آزمایش، تغییراتی در آن انجام شد. براساس دستورالعمل کیت مذکور، هموگلوبین گلایکه شده در مجاورت استیک اسید هیدرولیز و به ۵- هیدروکسی متیل فومارال تبدیل می‌گردد. سپس پروتئین‌های موجود در محیط توسط کلرواستیک اسید رسوب داده شده و مایع رویی با یک معرف رنگزا (تیوباربیتوریک اسید) واکنش داده و در نهایت پیگمان زرد رنگی ایجاد گردید. در مرحله بعدی با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (BioTek, USA) شدت رنگ ایجاد شده در طول موج ۴۳۳ نانومتر قرائت شد. با استفاده از استانداردهای موجود در داخل کیت منحنی استاندارد رسم گردید و در نهایت غلظت HbA1c موجود در نمونه‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد. مقدار نور جذب شده توسط محلول، تابع قوانین بئر و لمبرت است. طبق این قانون، هر گاه یک اشعه نور تک رنگ از درون محلولی با رنگ مکمل عبور کند، مقدار نور جذب شده توسط محلول، با غلظت آن نسبت مستقیم دارد (Casasanta *et al.*, 2022). در حقیقت در این روش با استفاده از ۵- هیدروکسی متیل فومارال تولید شده، غلظت HbA1c برحسب درصد احصا گردید.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

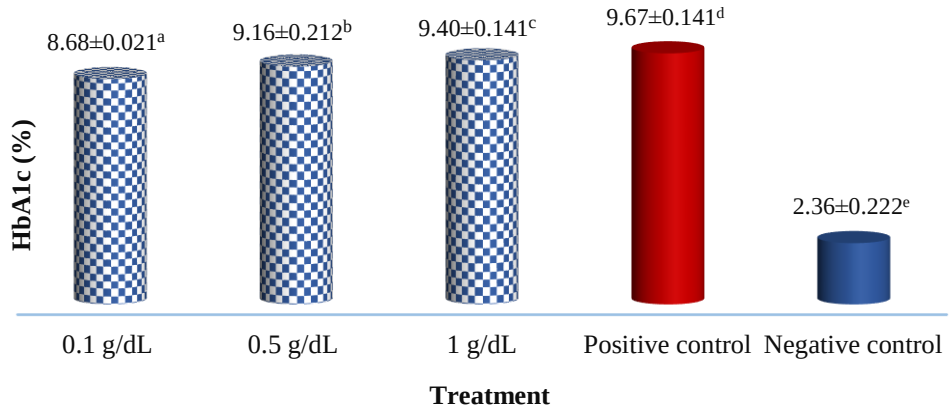
این مطالعه در قالب مقایسه گروه‌های مختلف تیمار و کنترل انجام شد. تیمارها شامل سه غلظت عصاره هیدروالکلی بنه کوهی ۰/۱، ۰/۵ و ۱ g.dL^{-1} در دو سطح گلوکز ۲۰ و ۴۰ mmol.L^{-1} بودند. همچنین برای هر سطح گلوکز، یک

گروه کنترل مثبت (حاوی هموگلوبین و گلوکز بدون عصاره) و یک گروه کنترل منفی (حاوی هموگلوبین بدون گلوکز و عصاره) در نظر گرفته شد. میزان تشکیل HbA1c در دو زمان ۷ و ۱۴ روز پس از انکوباسیون مورد ارزیابی قرار گرفت.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون Shapiro–Wilk بررسی گردید. نتایج نشان داد که داده‌ها از توزیع نرمال پیروی می‌کنند ($P > 0.05$). سپس به منظور مقایسه میانگین میزان تشکیل HbA1c بین گروه‌های درمانی و گروه کنترل مثبت، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. در موارد وجود اختلاف معنی‌دار، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post hoc test) انجام گردید. سطح معنی‌داری آماری در تمامی آزمون‌ها $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تأثیر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی بنه کوهی بر روی میزان تشکیل هموگلوبین گلایکه شده در شرایط هایپرگلیسمیک ۲۰ میلی‌مولار گلوکز نشان داد که در روز هفتم از انجام آزمایش، میزان تشکیل هموگلوبین A1c در گروه‌های درمانی با غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر عصاره هیدروالکلی بنه کوهی نسبت به گروه کنترل مثبت (شامل هموگلوبین و گلوکز با غلظت ۲۰ میلی‌مولار) به صورت معنی‌دار کمتر بود ($P < 0.05$) (شکل ۲).



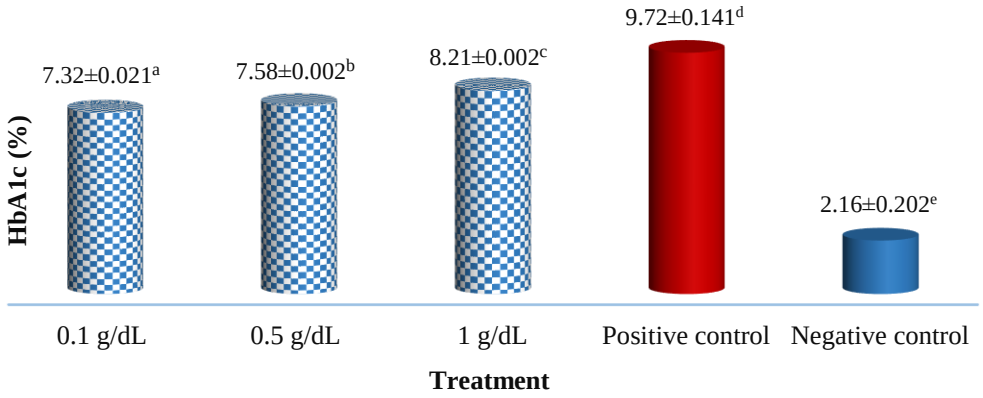
شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بنه کوهی بر میزان تشکیل هموگلوبین **A1c** در خون سگ (پس از هفت روز)

Figure 2. Comparison of mean HbA1c levels (after 7 days) in dogs blood affected by *Pistacia atlantica* hydroalcoholic extract

Positive control: hemoglobin and glucose (20 mmol.L^{-1}) without the hydroalcoholic extract and Negative control: hemoglobin alone without glucose or the hydroalcoholic extract.

Means (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level (Tukey test).

همچنین آنالیز نتایج در روز چهارده نیز نشان داد که کاهش تشکیل هموگلوبین A1c در گروه‌های درمانی مذکور نسبت به گروه کنترل مثبت (شامل هموگلوبین و گلوکز با غلظت ۲۰ میلی‌مولار) به‌طور معنی‌دار کمتر می‌باشد ($P < 0.05$) (شکل ۳).



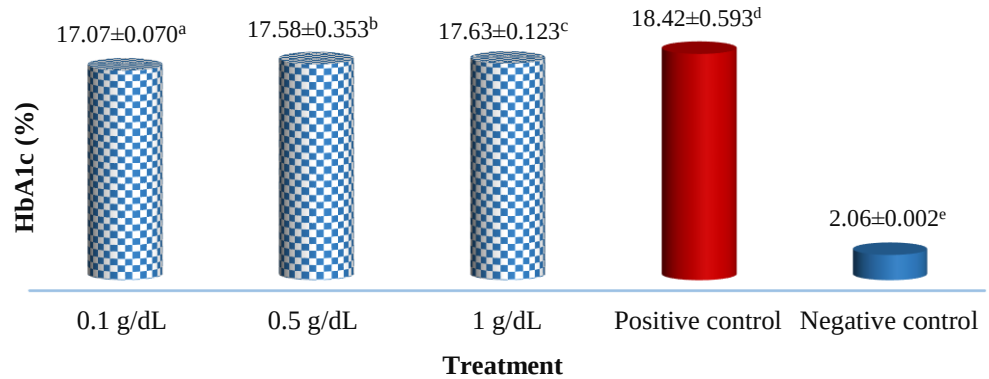
شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بنه کوهی بر میزان تشکیل هموگلوبین **A1c** در خون سگ (پس از ۱۴ روز)

Figure 3. Comparison of mean HbA1c levels (after 14 days) in dogs blood affected by *Pistacia atlantica* hydroalcoholic extract

Positive control: hemoglobin and glucose (20 mmol.L^{-1}) without the hydroalcoholic extract and Negative control: hemoglobin alone without glucose or the hydroalcoholic extract.

Means (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level (Tukey test).

همچنین نتایج تحلیل آماری نشان داد که در شرایط هایپرگلیسمیک با غلظت ۴۰ میلی‌مولار گلوکز، در روز هفتم از انجام آزمایش، میزان تشکیل هموگلوبین A1c در گروه‌های درمانی با غلظت ۰/۱، ۰/۵ و ۱ گرم بر دسی‌لیتر عصاره هیدروالکلی بنه کوهی نسبت به گروه کنترل مثبت (شامل هموگلوبین و گلوکز با غلظت ۴۰ میلی‌مولار) به‌طور معنی‌دار کمتر می‌باشد ($P < 0.05$) (شکل ۴).



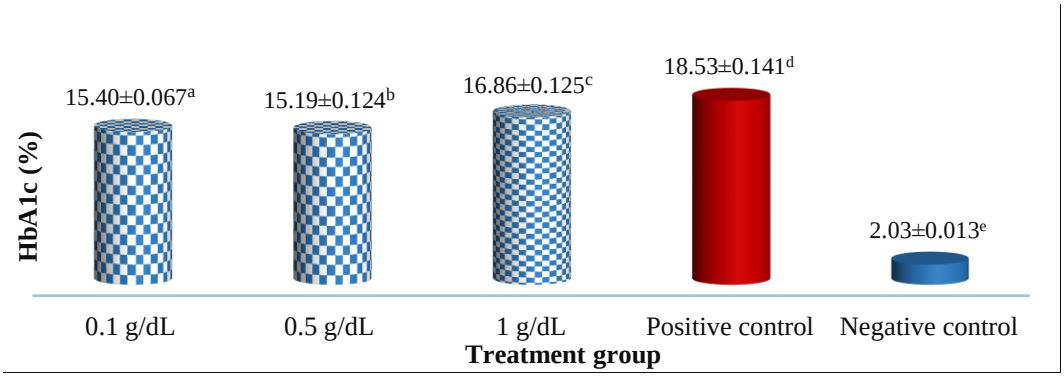
شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بنه کوهی بر میزان تشکیل هموگلوبین **A1c** در خون سگ (پس از هفت روز)

Figure 4. Comparison of mean HbA1c levels (after 7 days) in dogs blood affected by *Pistacia atlantica* hydroalcoholic extract

Positive control: hemoglobin and glucose (40 mmol.L^{-1}) without the hydroalcoholic extract and Negative control: hemoglobin alone without glucose or the hydroalcoholic extract.

Means (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level (Tukey test).

در همین غلظت گلوکز در روز چهاردهم نیز نتایج حکایت از کاهش معنی‌دار میزان تشکیل هموگلوبین A1c نسبت به گروه کنترل مثبت (شامل هموگلوبین و گلوکز با غلظت ۴۰ میلی‌مولار) در غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی بنه کوهی داشت ($P < 0.05$) (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه بنه کوهی بر میزان تشکیل هموگلوبین **A1c** در خون سگ (پس از ۱۴ روز)

Figure 5. Comparison of mean HbA1c levels (after 14 days) in dogs blood affected by *Pistacia atlantica* hydroalcoholic extract

Positive control: hemoglobin and glucose (40 mmol.L^{-1}) without the hydroalcoholic extract and Negative control: hemoglobin alone without glucose or the hydroalcoholic extract.

Means (± standard deviation) followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level (Tukey test).

با توجه به نمودارهای نمایش داده شده، به‌نظر می‌رسد متغیر زمان (افزایش زمان مجاورت عصاره هیدروالکلی و هموگلوبین) نقش مشخصی در کاهش میزان تولید هموگلوبین A1c دارد. این در حالیست که افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی الزاماً با کاهش قنددار شدن پروتئین همراه نبود.

بحث

به‌دنبال مقاومت بدن در برابر انسولین و یا عدم تولید کافی انسولین، سطح گلوکز خون به‌صورت غیرعادی افزایش یافته و نامتعادل می‌گردد (Lee *et al.*, 2022). مصرف برخی داروهای شناخته شده و مکمل‌ها ازجمله مکمل‌های گیاهی کمک می‌نمایند سطح گلوکز خون به سطح متعادل برسد (Nelson, 2000). از گیاهان متعددی برای متعادل‌سازی قند خون استفاده شده است. مواد مؤثر موجود در گیاهان دارویی مختلف از طریق سازوکارهای متفاوتی قادر به کاهش قند خون هستند. عمده این سازوکارها شامل افزایش ترشح انسولین، فعال کردن مسیر کاتابولیسم گلوکز، مهار یا غیرفعال کردن مسیر گلوکونئوژنز، هدایت گلوکز به داخل سلول و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Sun *et al.*, 2021).

غلظت گلوکز و مدت زمان مواجهه آن با هموگلوبین، دو عامل مهم تأثیرگذار بر بروز واکنش میلارد است. به‌طوری‌که به‌دنبال افزایش قند خون به مدت طولانی، واکنش میلارد با شدت بیشتری رخ می‌دهد. البته مهار تشکیل پروتئین‌های قنددار شده مانند هموگلوبین HbA1c به‌منظور پیشگیری از بروز عوارض ثانویه در موارد ابتلا بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Mansour *et al.*, 2023).

در این مطالعه با استفاده از سنجش شدت جذب نور (متعاقب افزایش گلوکز)، اتصال گروه هم به گلوبین تضعیف شده و تغییرات ساختاری در ساختمان هموگلوبین منجر به کاهش میزان جذب نور می‌گردد (Soleimani & Shahanipour, 2017). میزان گلایکه شدن هموگلوبین در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی میوه بنه کوهی به‌صورت کیفی، به روش کالریمتریک، بررسی شد. اثرهای ضد دیابتی و تعدیل‌کنندگی قند خون گیاه بنه کوهی قبلاً در مطالعات مختلفی در انسان و رت به اثبات

رسیده است. ازاین‌رو، ایده این مطالعه استفاده از بنه کوهی به‌منظور کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c در سگ، به‌دلیل اثربخشی مناسب آن بر کاهش میزان قند خون در مطالعات انجام شده در گذشته در انسان و سایر گونه‌ها بود. از سوی دیگر، با توجه به اینکه متغیر اصلی این مطالعه، میزان تشکیل هموگلوبین A1c به عنوان عامل اصلی عوارض ثانویه افزایش قند خون بود، بنابراین تأثیر مستقیم عصاره هیدروالکلی گیاه مذکور بر روی کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c در شرایط برون‌تنی بررسی شد.

همان‌طور که در این مطالعه مشاهده شد، در تمامی غلظت‌های عصاره هیدروالکلی بنه کوهی در روز هفت و چهارده و در شرایط ۲۰ و ۴۰ میلی‌مولار غلظت گلوکز، در مقایسه با گروه کنترل مثبت، میزان تشکیل هموگلوبین A1c به‌صورت معنی‌دار کاهش یافته بود. در مطالعه (Devi *et al.*, 2023) اثرهای ضد دیابتی دو گیاه هلیله سیاه و آشواگاندا در شرایط درون‌تنی در سگ انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که گیاهان مذکور در مقایسه با گروه کنترل مثبت منجر به کاهش میزان هموگلوبین A1c می‌گردد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر، اثرهای کاهنده گیاه خیار تلخ بر روی میزان تشکیل هموگلوبین A1c، در سگ (در شرایط درون‌تنی) به اثبات رسیده است (Das & Lodh, 2019). از لحاظ اثربخشی، نتایج دو مطالعه اخیر با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی دارد. البته مطالعات دیگری نیز در مورد کنترل افزایش قند خون در سگ‌ها با استفاده از گیاهان دارویی، با اندازه‌گیری سایر پارامترهای خونی مرتبط، انجام شده است. در نمونه‌ای از این تحقیقات، اثر کاهندگی کورکومین که جزء فعال عصاره زردچوبه می‌باشد، بر میزان قند خون ناشتا در سگ گزارش گردیده است (Suemanotham *et al.*, 2022). همچنین Andereani و همکاران (۲۰۱۷) نیز در مطالعه خود، اثر مثبت کندر هندی بر کاهش میزان قند خون ناشتا در سگ را گزارش نمودند (Andreani *et al.*, 2017). این مطالعات نیز از لحاظ اثربخشی با این مطالعه همخوانی دارد.

نکته قابل تأمل دیگر در این مطالعه، افزایش تأثیرپذیری عصاره هیدروالکلی بر روی کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c به‌دنبال افزایش زمان انکوباسیون از هفت به چهارده روز می‌باشد. نکته اخیر تأییدکننده تأثیر عوامل محیطی ازجمله مدت زمان مواجهه عصاره هیدروالکلی و هموگلوبین بر روی میزان گلیکاسیون است. از سوی دیگر، ایجاد HbA1c در واکنش میلارد، فقط واکنشی غیر آنزیمی بوده و غلظت مواد (شامل گلوکز، عصاره هیدروالکلی بنه کوهی و هموگلوبین)، تأثیر مستقیم بر ایجاد هموگلوبین A1c دارد (Fattahpour *et al.*, 2015). همچنین نتایج این مطالعه نشان داد مؤثرترین غلظت برای تأثیرگذاری بهتر عصاره هیدروالکلی بنه کوهی، ۰/۱ گرم بر دسی‌لیتر می‌باشد.

همان‌طور که مشاهده گردید به‌دنبال افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی، به استثناء روز ۱۴ و غلظت ۴۰ میلی‌مولار گلوکز، میزان تولید HbA1c در مقایسه با گروه کنترل مثبت، با وجود معنی‌دار بودن، کمتر کاهش یافته بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت همواره افزایش غلظت عصاره هیدروالکلی بنه کوهی به‌معنی افزایش اثربخشی نخواهد بود و می‌بایستی غلظت‌سنجی به‌منظور شناسایی و انتخاب غلظت مؤثر و مناسب عصاره گیاهی انجام شود.

البته سازوکار دقیق اثر عصاره هیدروالکلی بنه کوهی بر مهار تشکیل HbA1c در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفت، با این حال، به نظر می‌رسد ترکیبات زیست‌فعال موجود در این گیاه در بروز این اثر نقش داشته باشد. گزارش شده است که میوه و صمغ گیاه *Pistacia atlantica* حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و سایر متابولیت‌های ثانویه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Memariani *et al.*, 2024). این ترکیبات می‌توانند از طریق خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن و مهار مراحل اولیه واکنش میلارد، از تشکیل محصولات گلیکاسیون پیشرفته (AGEs) جلوگیری نمایند (Perrone *et al.*, 2020). از سوی دیگر، برخی ترکیبات پلی‌فنولی قادرند با ترکیبات کربونیلی حاصل از گلوکز واکنش داده و بدین ترتیب از اتصال آنها به گروه‌های آمینی پروتئین‌ها جلوگیری کنند. بنابراین احتمال می‌رود کاهش میزان HbA1c مشاهده شده در این مطالعه حداقل تا حدودی ناشی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدگلیکاسیونی

ترکیبات موجود در عصاره بنه کوهی باشد (Khan *et al.*, 2020).

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان ادعا نمود، براساس نتایج این مطالعه، عصاره میوه گیاه بنه‌کوهی می‌تواند انتخاب مناسبی به عنوان مکمل درمانی به‌منظور کاهش میزان تشکیل هموگلوبین A1c در سگ‌های دیابتی باشد. البته تکمیل این نظریه نیاز به انجام کارآزمایی بالینی به‌منظور شناسایی غلظت درمانی مؤثر در شرایط درون‌تنی، بررسی عوارض بالینی احتمالی عصاره گیاهی و ارزیابی سایر پارامترهای مرتبط دارد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از نتایج مربوط به پایان‌نامه مقطع دکتری حرفه‌ای دامپزشکی نویسنده اول می‌باشد. بدین‌وسیله نویسندگان از تمامی کارکنان محترم مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و سایر افرادی که در مراحل مختلف انجام این مطالعه یاری‌رسان بودند، کمال تشکر را دارند.

References

- Andreani, G., Ferlizza, E., Macrì, E., Beghelli, D. and Isani, G., 2017. Effect of *boswellia serrata* supplementation in addition to insulin on glycemic control in a diabetic dog. Slovenian Veterinary Research, 54(4): 173-179. Doi: 10.26873/SVR-248-2017
- Casasanta, G., Falcini, F. and Garra, R., 2022. Beer–Lambert law in photochemistry: A new approach. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 432: 114086. Doi: 10.1016/j.jphotochem.2022.114086
- Das, S. and Lodh, C., 2019. Therapeutic management of canine diabetes mellitus using herbal therapy combined with insulin, restricted fat and high fiber diet. Indian Journal of Canine Practice, 11(2): 98-101. Doi: 10.29005/IJCP.2019.11.2.098-101
- Davison, L., 2023. The genetics of endocrine disease: 350-358. In: Mooney, C.T. and Peterson, M.E., (Eds.). BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology. British Small Animal Veterinary Association, United Kingdom, 358p. https://bibliotheque.ensv.dz/index.php?lvl=notice_display&id=19706
- Devi, G., Dimri, U., Ajith, Y., Deepa, P., Yatoo, M., Gopalakrishnan, A. and Madhesh, E., 2023. The anti-oxidant and the anti-diabetic effects of *Terminalia chebula* and *Withania somnifera* in subclinically diabetic dogs. Indian Journal of Animal Research, 57: 1042-1050. Doi: 10.18805/IJAR.B-4355
- Fattahpour, S., Hosseini, F., Hajizadeh, M.R., Asadpour, M., Hassanshahi, Gh., Mirzaii, M.R. and Mahmoodi, M., 2015. Surveying the effect of hydroalcoholic extract of *Allium hirtifolium* on glycated hemoglobin formation in in-vitro condition. Journal of Advanced Biomedical Sciences, 5: 92-101. (In persian) https://jabs.fums.ac.ir/article-1-685-en.html.
- Ghafouri-khosrowshahi, A., Farzami, B. and Mohammadi-bardbori, A., 2007. The inhibitory effect of garlic extract on formation of glycated hemoglobin and AGEPs. Journal of Medical Sciences, 7(6): 1039-1043. Doi: 10.3923/jms.2007.1039.1043
- Jia, W., Guo, A., Zhang, R. and Shi, L., 2023. Mechanism of natural antioxidants regulating advanced glycosylation end products of Maillard reaction. Food Chemistry, 404: 134541. Doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134541
- Karimabad, M.N., Niknia, S., Golnabadi, M.B., Poor, S.F. and Hajizadeh, M.R., 2020. Effect of *Citrullus colocynthis* extract on glycated hemoglobin formation (in vitro). The Eurasian Journal of Medicine, 52: 47-51. Doi: 10.5152/eurasianjmed.2020.19223
- Khan, M., Liu, H., Wang, J. and Sun, B., 2020. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. Food Research International, 130: 108933. Doi: 10.1016/j.foodres.2019.108933
- Lee, S.H., Park, S.Y. and Choi, C.S., 2022. Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies. Diabetes & Metabolism Journal, 46(1): 15-37. Doi: 10.4093/dmj.2021.0280
- Mansour, H., Ghanem, M., Abdel-raoof, Y. and Helal, M.A., 2023. Evaluation of long-term complications of diabetes mellitus in dogs. Benha Veterinary Medical Journal, 45: 26-31. Doi:10.21608/bvmj.2023.230758.1712
- Memariani, Z., Tatari, M., Zahedi, M., Hesari, Z., Davarian, A. and Kolangi, F., 2024. Evaluation of the

effect of *Pistacia atlantica* oleoresin on blood sugar, pressure and lipids in patients with type 2 diabetes: A single-blind, placebo-controlled trial. Endocrinology, Diabetes & Metabolism, 7: e504. Doi: 10.1002/edm2.504
- Nelson, R.W., 2000. Oral medications for treating diabetes mellitus in dogs and cats. Journal of Small Animal Practice, 41: 486-490. Doi: 10.1111/j.1748-5827.2000.tb03969.x
- Parker, V.J. and Hill, R.C., 2023. Nutritional management of cats and dogs with diabetes mellitus. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, 53: 657-674. Doi: 10.1016/j.cvsm.2023.01.007
- Perrone, A., Giovino, A., Benny, J. and Martinelli, F., 2020. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020: 3818196. Doi: 10.1155/2020/3818196. eCollection 2020
- Soleimani, M. and Shahanipour, K., 2017. Hydroalcoholic extracts effect of *Rosa damascena* Mill and *Anethum graveolens* on the proteins glycosylation in vitro. Journal of Medicinal Plants, 16: 108-119. (In persian) https://jmp.ir/article-1-1418-en.html
- Sourris, K.C., Watson, A. and Jandeleit-dahm, K., 2021. Inhibitors of Advanced Glycation End product (AGE) formation and accumulation: 395-423. In: Schmidt, H.H.H.W., Ghezzi, P. and Cuadrado, A., (Eds.). Reactive Oxygen Species: Network Pharmacology and Therapeutic Applications. Springer International Publishing, 425p. Doi: 10.1007/164_2020_391
- Suemanotham, N., Phochantachinda, S., Chatchaisak, D., Sakcamduang, W., Chansawhang, A., Pitchakarn, P. and Chantong, B., 2023. Antidiabetic effects of *Andrographis paniculata* supplementation on biochemical parameters, inflammatory responses, and oxidative stress in canine diabetes. Frontiers in Pharmacology, 14: 1077228. Doi: 10.3389/fphar.2023.1077228
- Suemanotham, N., Photcharatinnakorn, P., Chantong, B., Buranasinsup, S., Phochantachinda, S., Sakcamduang, W., Reamtong, O., Thiangtrongjit, T. and Chatchaisak, D., 2022. Curcuminoid supplementation in canine diabetic mellitus and its complications using proteomic analysis. Frontiers in Veterinary Science, 9: 1057972. Doi: 10.3389/fvets.2022.1057972
- Sun, J., Ren, J., Hu, X., Hou, Y. and Yang, Y., 2021. Therapeutic effects of Chinese herbal medicines and their extracts on diabetes. Biomedicine & Pharmacotherapy, 142: 111977. Doi: 10.1016/j.biopha.2021.111977
- Yousof ali, M., Jannat, S. and Mizanur Rahman, M., 2021. Ginsenoside derivatives inhibit advanced glycation end-product formation and glucose-fructose mediated protein glycation in vitro via a specific structure-activity relationship. Bioorganic Chemistry, 111: 104844. Doi: 10.1016/j.bioorg.2021.104844