

**EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT OF OLIVE LEAVES ON BLOOD GLUCOSE AND CHOLESTEROL LEVELS IN DIABETIC RABBITS**

F. AL-KAZAK\*, A. AL-ABD\*\* and T. KANBAR\*\*\*.

\* Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Al Baath University, Hama, Syria.

\*\* Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine Al Baath University, Hama, Syria.

\*\*\* Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Al Baath University, Hama, Syria.

**ABSTRACT**

The present study aims to investigate the effect of ethanolic extract of Olive leaves (*Olea europaea* L.) on blood glucose and cholesterol levels in diabetic rabbits. Diabetes was induced in rabbits by intraperitoneal injection of alloxan. The experiment was carried out on 36 rabbits of both sexes weighing between (2100-2500gm). The experimental animals were divided into 3 groups, each group consisting of 12 animals. The first group was left as control, while the second and third groups, they were rendered diabetic by intraperitoneal injection of alloxan (175 mg/kg b.wt.). The second group was left as diabetic control, while the third was treated with the ethanolic extract of Olive leaves in a dose of 500 mg/kg b.wt. orally/ day for 4 weeks. Blood samples were collected weekly till the end of the experiment from the heart for determination of glucose and cholesterol levels. The results obtained showed that oral administration of Olive leaves ethanolic extract significantly decreased the high blood glucose and cholesterol levels of the treated diabetic rabbits, as compared to the diabetic control group. In conclusion, Olive leaves of ethanolic extract produces antidiabetic and hypocholesterol levels in alloxan-diabetic rabbits and it may be beneficial to help patients who suffer from diabetes mellitus.

**Received at: 13/2/2012**

**Accepted: 7/3/2012**

*Key words: Olive leaves, blood glucose, cholesterol.*

**تأثير الخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون على مستوى السكر والكوليسترول الكلي في الدم عند الأرانب المصابة بداء السكري**

**فراس القزق ، أسعد العبد ، طلة قنبر**

استهدف هذا البحث دراسة تأثير الخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون على مستوى السكر والكوليسترول الكلي في الدم عند الأرانب المصابة بداء السكري المحدث تجريبياً باستخدام الألوكسان. تم إجراء التجربة باستخدام (36) أرنباً من كلا الجنسين تتراوح أوزانها بين (2100-2500) غرام. قُسمت الأرانب إلى ثلاث مجموعات تتكون كل مجموعة من اثني عشر أرنباً. تُركت المجموعة الأولى كشاهدة سلبية (أرانب طبيعية). تم إحداث داء السكري في أرانب المجموعة الثانية والثالثة باستخدام الألوكسان بجرعة (175) ملغ/كغم من وزن الجسم عن طريق الحقن في التجويف البريتوني، وبقيت المجموعة الثانية مصابة من أجل المقارنة. أعطيت المجموعة الثالثة المصابة بداء السكري يومياً عن طريق

التجريب الفموي الخلاصة الكحولية الإيثانولية لأوراق الزيتون بتركيز (٥٠٠) ملغ/كغم من وزن الجسم لمدة أربعة أسابيع. أخذت عينات الدم من القلب مباشرة من أجل فحص مستوى سكر وكوليسترول الدم أسبوعياً (٤ أسابيع). وقد أظهرت النتائج أن إعطاء الخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون عن طريق الفم بالجرعة المستخدمة أدى إلى انخفاض معنوي جداً في مستوى سكر الدم وانخفاض معنوي فقط في مستوى كوليسترول الدم المرتفع عند الأرانب المصابة بداء السكري المُحدث تجريبياً بالألوكسان.

## مقدمة

## INTRODUCTION

توجّهت أنظار المحافل العلمية والطبية في السنوات الأخيرة من العقد المتصرم إلى الجواهر الفعالة التي تحتويها النباتات الطبية (Dekanski *et al.*, 2009)، وحازت الخلاصات النباتية على النصيب الأكبر من الدراسة كونها تحتوي على نسبة عالية من المواد الفعالة، خاصة الفلافونيدات وديدات الفينول كمضادات للأكسدة (Montvale, 2000). وبدأت الدراسات الحديثة في محاولة الاستفادة من قابلية بعض النباتات على خفض سكر الدم، ومنها أوراق الزيتون (سلطان ، ٢٠٠٦). تنتمي شجرة الزيتون إلى الفصيلة الزيتونية (Oleaceae) وجنس الزيتون (Olea) (Drown, 2001; Geo *et al.*, 2007)، وهي من الأشجار دائمة الخضرة (Lalas *et al.*, 2011)، وتشتهر منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط بزراعة أشجار الزيتون (Trichopoulou *et al.*, 1995)، فهي تحتوي على السكريات والغلوكوزيدات والصابونينات والراتنجات والقلويدات وحمض العفص بالإضافة إلى تراكيز مرتفعة من المواد الفينولية والفلافونيدات أهمها الأوليوروبين (oleuropein)، وهيدروكسي تيروزول (Hydroxytyrosol)، وحمض لينوليك (Oleanolic acid) (Briante *et al.*, 2002; Omar, 2010).

يُعرف الداء السكري diabetes mellitus بأنه متلازم يتميز بفرط غلوكوز الدم وخلل في استقلاب الكربوهيدرات والدهون والبروتينات المترافق مع نقص في إفراز الأنسولين (Schoenfelder *et al.*, 2006)، أو عدم فاعليته (Kamtchouing *et al.*, 2006). ويُعد الألوكسان من أفضل المواد المستخدمة في إحداث داء السكري التجريبي ومن أكثرها شيوعاً (Hashemi *et al.*, 2009)، عند الأرانب (Mahesar *et al.*, 2010) والجرذان (Radhika *et al.*, 2010) والفئران والكلاب وجرعة ١٤٠-١٨٠ ملغ/كغم من وزن الجسم (Etuk, 2010).

لقد استُخدمت شجرة الزيتون ولعدة قرون مضت (الزيت والأوراق) في مجال الطب الشعبي كمادة مخفضة للسكر وللحرارة (الزبيدي ، ١٩٩٦)، وضغط الدم وكموسعة للأوعية الدموية (Cheij, 1984).

- وجد الباحث (Fehri *et al.*, 1994) أن إعطاء إناث وذكور الجرذان تراكيز متزايدة من الخلاصة (٣٧٠، ٣٧٥، ٣٨٠، ٣٩٠، ٤٠٠، ٤١٠، ٤٢٠ ملغ /كغم من وزن الجسم) خلال ٢٤ ساعة ولمدة ٦٠ يوماً لم يؤدّي إلى تسجيل أية تأثيرات سميّة، كما أدت الخلاصة إلى زيادة الوزن وخفض ضغط الدم وخفض السكر عند هذه الجرذان.

- واستخدم الباحث (Khudiar, 2000) الخلاصة المائية لأوراق الزيتون في خفض مستوى الكوليسترول الكلي والدهون منخفضة الكثافة (LDL-C) (Low-Density Lipoproteins) والدهون قليلة الكثافة جداً (Very Lipoproteins) (Low-Density VLDL-C) في مصّل الجرذان المُحدث فيها تصلب الشرايين تجريبياً، فضلاً عن خفض شدة الإصابة بالتصلب العصيدي.

- وأثبتت دراسة الباحث (Benavente-Garcia *et al.*, 2000) تأثير الفينولات كمضاد للأكسدة وكمخفض لغلوكوز الدم وأهمها الأوليوروبين (Oleuropein) وهيدروكسي تيروزول (Hydroxytyrosol) عند الأرانب المصابة بداء السكري المُحدث تجريبياً بالألوكسان، حيث ظهر عندها انخفاض واضح في علامات الإجهاد التأكسدي عندما عولجت بالأوليوروبين.

- وقد قام (Al-azzawie and Alhamdani, 2005) بتجريب الأوليوروبين (Oleuropein) عن طريق الفم لذكور الأرانب المصابة بداء السكري المُحدث تجريبياً بالألوكسان، وقد لوحظ انخفاض معنوي في المانويل دي الدهيد (Malondialdehyde)، وفي سكر الدم عند جميع الأرانب المصابة تجريبياً بالسكري، وذلك خلال ١٦ أسبوعاً من المعالجة، وجرعة من الأوليوروبين قدرها ٢٠ ملغ/كغم من وزن الجسم. وعادت القيم السابقة إلى مستوياتها كما هو عند حيوانات مجموعة الشاهد، وأظهرت هذه التجربة الدور الفعال للأوليوروبين كمضاد للإجهاد التأكسدي وكمخفض لغلوكوز الدم.

- وفي دراسة الباحث (Andreadou *et al.*, 2006) جُرعت الأرناب المُحدث عندها فرط الكوليسترول تجريبياً خلاصة أوراق الزيتون الحاوية على الأوليوروبين بتركيز ١٠ و ٢٠ ملغ/كغ من وزن الجسم يومياً لمدة ستة أسابيع فوجد أنّ التركيز ٢٠ ملغ/كغ من وزن الجسم أدى إلى انخفاض مستوى الكوليسترول في مصل الدم بنسبة،  $34,7 \pm 4,4\%$ ، كما أدّى إلى انخفاض أكسدة الدهون في مصل الدم، بما فيها تركيز الشحوم الثلاثية، وبالتالي التقليل من خطر الإصابة بالاحتشاء، واقترح استخدام الأوليوروبين كمضاد لارتفاع شحوم الدم وكمضاد أكسدة ذو فعالية عالية.

- ذكر الباحث (Eidi *et al.* (2009) أنّ الجرعات الفموية للخلاصة الكحولية لأوراق الزيتون بتركيز (٠,١، ٠,٢٥، ٠,٥ غ/كغ) من وزن الجسم ولمدة ١٤ يوم أدّت الى انخفاض معنوي في غلوكوز المصل والكوليسترول والشحوم الثلاثية والبولية وحمض البولية والكرياتينين وأنزيم أسبارتات أمينوترانسفيراز (AST) والآنين أمينوترانسفيراز (ALT)، بينما زادت هذه الخلاصة مستوى هرمون الأنسولين في الجرذان المصابة بداء السكري المحدث تجريبياً، ولم تلاحظ هناك زيادة في الأنسولين عند الجرذان السليمة، وتمّت المقارنة بين مدى فعالية تأثير خلاصة أوراق الزيتون وعقار غليبينكلاميد (glibenclamide) وهو علاج شائع للداء السكري وتبيّن أنّ تأثير الخلاصة كمضاد للسكري كان أكثر فعالية من العقار السابق الذكر.

### هدف البحث

## OBJECTIVE OF THE STUDY

استهدف هذا البحث دراسة تأثير الخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون على مستوى السكر والكوليسترول الكلي في الدم عند الأرناب المصابة بداء السكري المحدث بالألوكسان.

### المواد وطرائق البحث

## MATERIALS and METHODS

أولاً: تحضير الخلاصة النباتية الكحولية الإيثانولية لأوراق الزيتون:

تمّ الاعتماد على الطريقة الموصوفة من قبل (Tshikalange *et al.*, 2005; Deshmuk and Brole, 1975) في تحضير الخلاصة الكحولية الإيثانولية لأوراق الزيتون وذلك بنقع 20 غرام من أوراق الزيتون في ٢٠٠-٣٠٠ مل من الكحول الإيثانولي 95% وحفظ المنقوع لمدة أسبوع بالتلاجة مع مراعاة التحريك المستمر لهذا المنقوع، وتمّ تغطيته بأكياس نايلون وبورق قصدير (سلفان) لمنع التبخر. رشّح هذا المنقوع باستعمال الشاش ثم ورق الترشيح من نوع Whatman No.1 ثمّ تسفيل الراشح بواسطة جهاز الطرد المركزي بقوة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق وتمّ التبخير في الفراغ باستعمال جهاز المبخر الدوراني بدرجة حرارة ٣٥°م، وبضغط سليلي ١٠٠ ميلي بار، وبدرجة حرارة لدارة التبريد ٤°م. حتى الحصول على الخلاصة المركزة على شكل سائل ذو قوام كثيف، هذا السائل المتبقي تمّ تجفيفه باستعمال الحمام المائي (Waterbath-(Model/BS20) Yamato-Japan بدرجة حرارة 37°م مدة 48-72 ساعة للحصول على الخلاصة المركزة شبه الصلبة والتي كانت بوزن (١٨,٢) غ/100 غ نبات والتي تحتوي للمواد الفعالة، حُضرت الخلاصة أسبوعياً، وتمّ حفظها في التلاجة بدرجة حرارة ٤°م لحين الاستخدام.

وتمّ تحضير محلول مائي من الخلاصة بتركيز ٢٥% وأضيف له tween80 بنسبة ٢% لإتمام الإذابة.

ثانياً: حيوانات التجربة:

تمّ استخدام ٣٦ أرناباً من كلا الجنسين تمّ شراؤها من السوق المحلية، وتراوح أوزانها بين ٢١٠٠-٢٥٠٠ غ. ووزعت إلى ثلاث مجموعات تتكون كل مجموعة من اثني عشر أرناباً، وتمّت تغذيتها على علف محبب خاص وكان الماء متاح لها بكمية كافية طيلة فترة التجربة.

ثالثاً: إحداث داء السكري في الأرناب بالألوكسان:

تمّ تصويم أرناب المجموعة الثانية والثالثة عن الطعام لمدة ٢٤ ساعة باستثناء الماء، وتمّ وزن كل أرناب، وحقنه بمادة الألوكسان (BDH, limited, pool, England) المحلول بالملح الفسيولوجي NaCl ٠,٩%، والذي حُضّر مباشرة عند الحقن وأعطى بجرعة ١٧٥ ملغ/كغ من وزن الجسم في التجويف البريتوني (Katsumata and Katsumata, 1990)، وأعطى لها بعد الحقن في اليوم الأول محلول الغلوكوز بتركيز ٢٠% مع ماء الشرب لمنع حدوث نقص السكر الحاد الناتج من تلف البنكرياس الذي قد يُؤدّي إلى هلاكها (Ananthan *et al.*, 2003)، ثمّ وُضع العلف بعد الحقن وتمّ التأكد من إحداث داء السكري في الأرناب المعاملة بعد مرور أسبوع من الحقن بالألوكسان، وذلك بأخذ عينات دم من

الوريد الأذني وإجراء فحوص دموية لقياس مستوى السكر، باستعمال جهاز قياس السكر (One Touch Horizen, USA sensor, life scan.)، حيث اعتبرت الأرناب التي تراوح مستوى سكر الدم عندها بين ١٨٠-٢٥٠ ملغ/دل مصابة بداء السكري كما ذكر (Etuk, 2010)، بينما تراوح مستوى سكر الدم عند الأرناب الطبيعية (مجموعة الشاهد) ما بين ٧٥-١٥٠ ملغ/١٠٠ ملى سليمة كما ذكر (Dimitrova et al., 2008).

رابعاً: التجربة:

تم تقسيم مجموعات التجربة كالتالي :

- ١ - المجموعة الأولى: مجموعة شاهدة (ضابط سلبي).
- ٢ - المجموعة الثانية : محقونة بالآلوكسان (مصابة بداء السكري) معاملة بالماء المقطر المضاف له 80 tween بنسبة ٢% حتى نهاية التجربة (ضابط ايجابي).
- ٣ - المجموعة الثالثة: محقونة بالآلوكسان (مصابة بداء السكري) ومعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون المحضرة بتركيز ٢٥ % بالماء المقطر، حيث تم تجريد هذه الخلاصة عن طريق الفم بجرعة ٥٠٠ ملغ/كغم من وزن الجسم يومياً ولمدة أربعة أسابيع متتالية وذلك بعد مرور أسبوع على حقنها بالآلوكسان. وتم قياس مستوى السكر والكوليسترول بالدم بعد أسبوع وأربعين وثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع لكل من المجموعة الثانية والثالثة وكذلك المجموعة الشاهدة.

خامساً: التحليل الإحصائي:

استُخدم اختبار التباين الأحادي One way ANOVA test لتحليل النتائج التي حصلنا عليها بواسطة برنامج Statistix-version1.0/Analytical software، تم الحصول على المتوسط الحسابي mean والانحراف المعياري، وتم احتساب الفرق معنوياً عند مستوى احتمال ( $p < 0.05$ ).

### النتائج

## RESULTS

١- مستوى سكر الدم:

- يُظهر الجدول رقم (١) وجود ارتفاع معنوي ( $p=0.0000$ ) في مستوى سكر الدم لدى أرناب المجموعة الثانية المحقونة بالآلوكسان حيث بلغ متوسط مستوى سكر الدم لديها  $4.32 \pm 187.29$  ملغ/١٠٠ ملى مقارنة مع المجموعة الشاهدة بتركيز قدره  $3.32 \pm 103.10$  ملغ/١٠٠ ملى ، أما في المجموعة الثالثة المعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون فقد انخفض متوسط مستوى سكر الدم فيها بشكل معنوي ( $p=0.0000$ ) حيث بلغ  $3.28 \pm 147.17$  ملغ/١٠٠ ملى وذلك بعد أسبوع من المعاملة بالخلاصة الإيثانولية.

أما بعد أسبوعين من المعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون، فقد لوحظ انخفاض معنوي ( $p=0.0000$ ) في متوسط مستوى سكر الدم في أرناب المجموعة الثالثة، حيث بلغ  $4.06 \pm 139.61$  ملغ/١٠٠ ملى ، وذلك بالمقارنة مع متوسط مستوى سكر الدم في أرناب المجموعة الثانية المصابة بالسكري والذي بلغ  $4.18 \pm 193.99$  ملغ/١٠٠ ملى ، أما المجموعة الشاهدة، فكان متوسط مستوى سكر الدم فيها  $4.36 \pm 107.65$  ملغ/١٠٠ ملى.

وفي الأسبوع الثالث من المعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون انخفض متوسط مستوى سكر الدم في أرناب المجموعة الثالثة معنوياً ( $p=0.0000$ ) حيث بلغ  $5.46 \pm 129.97$  ملغ/١٠٠ ملى ، مقارنة مع المجموعة الثانية المصابة بالسكري التي ارتفع لديها متوسط مستوى سكر الدم معنوياً ( $p=0.0000$ ) حتى بلغ  $4.58 \pm 194.14$  ملغ/١٠٠ ملى مقارنة مع مجموعة الشاهد الطبيعي حيث كان متوسط مستوى سكر الدم فيها  $3.46 \pm 116.58$  ملغ/١٠٠ ملى.

وفي نهاية الأسبوع الرابع حدث انخفاض معنوي ( $p=0.0000$ ) في متوسط مستوى سكر الدم في أرناب المجموعة الثالثة حيث بلغ  $5.47 \pm 119.08$  ملغ/١٠٠ ملى مقارنة مع المجموعة الثانية المصابة بالسكري التي ارتفع لديها متوسط مستوى سكر الدم معنوياً ( $p=0.0000$ ) حتى بلغ  $5.05 \pm 200.68$  ملغ/١٠٠ ملى مقارنة مع مجموعة الشاهد الطبيعي حيث كان متوسط مستوى سكر الدم فيها  $7.38 \pm 109.17$  ملغ/١٠٠ ملى.

٢- مستوى كوليسترول الدم:

يُبين الجدول رقم (٢) وجود فرق معنوي ( $p=0.0000$ ) في متوسط منسوب الكوليسترول الكلي في الدم لدى أرناب المجموعة الثانية المحقونة بالآلوكسان حيث كان المتوسط عندها  $5.73 \pm 60.55$  ملغ/١٠٠ ملى مقارنة مع المجموعة الشاهدة وبتركيز قدره  $6.27 \pm 44.29$  ملغ/١٠٠ ملى ، ولوحظ عدم وجود فروقات معنوية ( $p=0.18$ ) في متوسط منسوب الكوليسترول الكلي لدى أرناب المجموعة الثالثة بتركيز وقدره  $6.46 \pm 57.16$  ملغ/١٠٠ ملى مقارنة مع المجموعة الثانية بعد أسبوع من المعاملة. ولكن بعد أسبوعين من المعاملة انخفض منسوب الكوليسترول الكلي لدى

أرانب المجموعة الثالثة معنويًا ( $p=0.0000$ ) وكان المتوسط  $4.46 \pm 55.08$  ملغ/100 مل مقارنة مع المجموعة الثانية حيث بلغ المتوسط  $6.23 \pm 68.45$  ملغ/100 مل، كما وجد ارتفاع معنوي ( $p=0.0000$ ) في منسوب الكوليسترول الكلي عند أرانب المجموعة الثانية مقارنة مع المجموعة الأولى.

كما أحدثت المعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون ولمدة ثلاثة أسابيع انخفاضًا معنويًا ( $p=0.0000$ ) بمنسوب الكوليسترول في المجموعة الثالثة وبمتوسط  $3.81 \pm 53.41$  ملغ/100 مل بالمقارنة مع المجموعة الثانية والتي بلغ مستوى الكوليسترول عندها  $5.50 \pm 74.31$  ملغ/100 مل، وكان متوسط تركيز الكوليسترول في الدم عند المجموعة الشاهد  $3.86 \pm 44.79$  ملغ/100 مل.

وفي نهاية الأسبوع الرابع من المعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون أصبح متوسط مستوى كوليسترول الدم هو  $3.72 \pm 51.73$  ملغ/100 مل في المجموعة الثالثة مقارنة مع المجموعة الثانية التي كان متوسط مستوى كوليسترول الدم عندها  $4.04 \pm 89.07$  ملغ/100 مل، وهذا أشار إلى انخفاض المتوسط معنويًا ( $p=0.0000$ )، فيما كان متوسط مستوى الكوليسترول في المجموعة الشاهد  $3.77 \pm 48.92$  ملغ/دل.

الجدول رقم (1): يبين تركيز سكر الدم (المتوسط  $\pm$  الانحراف المعياري) مقدرًا بـ (ملغ/دل) في كل من المجموعة الشاهدة والمجموعة المصابة بداء السكري والمجموعة المعاملة بالخلاصة الإيثانولية المحضرة بالماء المقطر لأوراق الزيتون خلال فترة التجربة. تشير الأحرف a, b, c إلى المجموعات المتغايرة احصائياً عند مستوى معنوية ( $p < 0.05$ )، بحيث أن  $a > b > c$  وذلك ضمن الصف الواحد، ( $n=12$ ).

المجموعة	المجموعة الأولى: (الشاهد الطبيعي)	المجموعة الثانية: مصابة بالسكري ومعاملة بالماء المقطر المضاف له Tween80 بنسبة 2%	المجموعة الثالثة: مصابة بالسكري ومعاملة بالخلاصة الإيثانولية المحضرة بالماء المقطر لأوراق الزيتون بجرعة 500 ملغ/كغ
بعد أسبوع	$3.32 \pm 103.10^c$	$4.32 \pm 187.29^a$	$3.28 \pm 147.17^b$
بعد أسبوعين	$4.36 \pm 107.65^c$	$4.18 \pm 193.99^a$	$4.06 \pm 139.61^b$
بعد ثلاث أسابيع	$3.46 \pm 116.58^c$	$4.58 \pm 194.14^a$	$5.46 \pm 129.97^b$
بعد أربع أسابيع	$7.38 \pm 109.17^c$	$5.05 \pm 200.68^a$	$5.47 \pm 119.08^b$
المتوسط الحسابي	$5.59 \pm 109.12^c$	$5.46 \pm 194.03^a$	$12.16 \pm 133.96^b$

الجدول رقم (2): يبين تركيز كوليسترول الدم (المتوسط  $\pm$  الانحراف المعياري) مقدرًا بـ (ملغ/دل) في كل من المجموعة الشاهدة والمجموعة المصابة بداء السكري والمجموعة المعاملة بالخلاصة الإيثانولية المحضرة بالماء المقطر لأوراق الزيتون خلال فترة التجربة. تشير الأحرف a, b, c إلى المجموعات المتغايرة احصائياً عند مستوى معنوية ( $p < 0.05$ )، بحيث أن  $a > b > c$  وذلك ضمن الصف الواحد، ( $n=12$ ).

المجموعة	المجموعة الأولى: (الشاهد الطبيعي)	المجموعة الثانية: مصابة بالسكري ومعاملة بالماء المقطر المضاف له Tween80 بنسبة 2%	المجموعة الثالثة: مصابة بالسكري ومعاملة بالخلاصة الإيثانولية المحضرة بالماء المقطر لأوراق الزيتون بجرعة 500 ملغ/كغ
بعد أسبوع	$6.27 \pm 44.29^b$	$5.73 \pm 60.55^a$	$6.46 \pm 57.16^a$
بعد أسبوعين	$7.34 \pm 49.39^c$	$6.23 \pm 68.45^a$	$4.46 \pm 55.08^b$
بعد ثلاث أسابيع	$3.86 \pm 44.79^c$	$5.50 \pm 74.31^a$	$3.81 \pm 53.41^b$
بعد أربع أسابيع	$3.77 \pm 48.92^c$	$4.04 \pm 89.07^a$	$3.72 \pm 51.73^b$
المتوسط الحسابي	$2.67 \pm 46.85^c$	$12.05 \pm 73.09^a$	$2.32 \pm 54.35^b$

المناقشة

DISCUSSION

١- تأثير الخلاصة الكحولية الإيثانولية لأوراق الزيتون على مستوى سكر الدم :  
يُعد الألوكسان مركب كيميائي مُشتق من حمض اليوريك وهو على شكل بودرة زهرية اللون وسهلة الانحلال بالماء، كما يُستخدم هذا المركب بشكل أساسي في علاج سرطان غدة البنكرياس، وقد أكد الباحث (Dubey et al., 1994) فعالية استخدام الألوكسان في استحداث السكري التجريبي عند مختلف حيوانات التجربة.

يُبين الجدول رقم (١) ارتفاع في منسوب سكر الدم في المجموعة الثانية (مجموعة الألوكسان) بعد أسبوع من حقن الأرانب بهذه المادة، واستمر الارتفاع التدريجي لسكر الدم حتى نهاية التجربة وبمتوسط قدره  $5.46 \pm 194.03$  ملغ/١٠٠ ملي ، ويُرجح السبب في ذلك إلى اختزال مركب الألوكسان داخل الجسم إلى حامض دايلوريك (Dialuric acid) والذي يُمارس تأثيره الهدام عن طريق تحرير أنواع الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen species (Takasu et al., 1991)، التي لها القدرة على مهاجمة جزر لانغرهانس في البنكرياس وبالتحديد خلايا بيتا المحررة للأنسولين ممارسة بذلك تأثيراً مخططاً عن طريق التلف التأكسدي (Tiedge et al., 1997). وبسبب تركيبه البنوي المشابه للجلوكوز يستطيع الألوكسان الارتباط بمستقبلات الجلوكوز في أغشية خلايا بيتا والعبور إلى داخل الخلايا (Hashemi et al., 2009) ، ويسبب تجزئة خيطية للحمض النووي ال DNA الخاص بخلايا بيتا في جزر لانغرهانس في البنكرياس (Szkudelski, 2001; Park et al., 1995; Okamoto, 1985).

كما أن للألوكسان تأثيراً فعالاً في المركبات الحاوية على مجموعة السلفهيدريل (Sulf hydryl=SH group) التي تدخل في تركيب الأنزيمات لاسيما أنزيم جلوكوكاينيز (Glucokinase) المسؤول عن استقلاب الجلوكوز مما يؤدي إلى فقدان فعاليته (Lenzen et al., 1992).

يعمل الألوكسان على رفع مستوى الأنسولين في الساعات الأولى بعد الحقن مباشرة مما يؤدي إلى انخفاض حاد في مستوى الجلوكوز في الدم ويتبعها انعدام تام لاستجابة خلايا بيتا لمستوى الجلوكوز في الدم (Wilson et al., 1984)، لذلك تم وضع محلول سكري ٢٠% بماء الشرب لتفادي حدوث الصدمة.

من خلال الجدول رقم (١) نلاحظ أن الخلاصة الكحولية لأوراق الزيتون أدت إلى انخفاض معنوي في مستوى سكر الدم و بمتوسط قدره  $123.96 \pm 12.16$  ملغ/دل بينما كان المتوسط الحسابي لمستوى سكر الدم في المجموعة الثانية المصابة بداء السكري المحدث بالالوكسان  $194.03 \pm 5.46$  ملغ/دل .

إن ما تتميز به الخلاصة من قدرة على خفض سكر الدم في المجموعة الثالثة المعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون تعكس تأثير النبات على عمليات استقلاب الكربوهيدرات في الجسم، وهذا يتفق مع وصل إليه الباحث عبد الرحمن، (٢٠٠٢) في ذكور الأرانب، وكذلك تتفق مع نتائج الباحث عبد الرحمن ، صائب يونس (١٩٩٥) في الجرذان المصابة بداء السكري المحدث بالالوكسان، وتتفق كذلك مع نتائج الباحث (Eidi et al., 2009)، حيث أكد أن اعطاء الخلاصة الكحولية لأوراق الزيتون أدت إلى انخفاض معنوي في سكر الدم، وزادت مستوى هرمون الأنسولين في الجرذان المصابة بداء السكري المحدث تجريبياً. ويتوافق أيضاً مع نتائج كل من (Aguilar et al., 2002); (Jemai et al., 2009); Alarcon- Verspohl (2002).

كما أن أوراق الزيتون يحتوي على المركب (Oleuropeoside) الذي يُسبب خفض جلوكوز الدم وذلك عن طريق زيادة من دخول الجلوكوز إلى الأنسجة وبذلك يخفض مستواه في الدم، تنشيط إفراز الأنسولين من البنكرياس (Gonzalez et al., 1992). وهذا ما أكدته كل من (Al-azzawie and Alhamdani (2005); Said et al. (2008). أو قد يكون السبب وراء خفض سكر الدم عند الأرانب المصابة بداء السكري المحدث تجريبياً هو ما تحتويه الخلاصة من نسبة مرتفعة من الفلافونويدات وأهمها الأوليوروبين (Oleuropein) وهيدروكسي تيروزول (Hydroxytyrosol)، وما لها من تأثيرات مضادة للأكسدة وكخافضة لسكر الدم (Benavente-Gareia et al., 2000) ويشارك حمض اللينوليك الموجود في أوراق الزيتون في بالتأثيرات الفعالة في خفض مستوى سكر الدم (Satoa et al., 2007).

٢- تأثير الخلاصة الكحولية الإيثانولية لأوراق الزيتون على مستوى كوليسترول الدم :  
يُبين الجدول رقم (٢) أن المعاملة بالخلاصة الإيثانولية لأوراق الزيتون أدت إلى انخفاض مستوى كوليسترول الدم في المجموعة الثالثة، وبمتوسط قدره  $54.35 \pm 2.32$  ملغ /١٠٠ ملي بينما كان متوسط مستوى كوليسترول الدم في المجموعة الثانية المصابة بداء السكري المحدث بالالوكسان  $73.09 \pm 12.05$  ملغ/١٠٠ ملي.

وقد لوحظ أن استخدام الألوكسان في استحداث الداء السكري أدى أيضاً إلى ارتفاع مستوى الكوليسترول في الدم عند الأرانب وهذا يتفق مع النتائج التي حصل عليها كل من (Prince *et al.* (2004); Rao *et al.* (1999) في الجرذان ونتائج (Sharma *et al.*, 2003; Al-hussary, 1993) في الأرانب. ويُمكن أن يُعزى ذلك إلى زيادة نشاط أنزيم أستيل مرافق -A- كوليسترول أستيل ترانسفيراز (Acetyl-Co-A-cholesterol acetyl-transferase) المسؤول عن امتصاص الكوليسترول من الأمعاء والتي تتحفز بغياب الأنسولين (Maechler *et al.*, 1993) كما أن انعدام الأنسولين أدى إلى زيادة مستوى الكوليسترول في الدم (Lenich *et al.*, 1990).

ويُمكن تفسير انخفاض منسوب الكوليسترول في الدم نتيجة احتواء أوراق الزيتون على نسبة مرتفعة من مادة الصابونين التي تُكوّن مع الكوليسترول معقدات غير ذائبة في تجويف القناة الهضمية مثبّطة امتصاص الكوليسترول من الأمعاء ومن ثم طرحه مع الفضلات كما أورد كل من (Petit *et al.* (1993); Al-hussary (1993)، فضلاً عن ذلك فإنّ للصابونين القدرة على الالتصاق مع أملاح الصنّفاء والشحوم المتعادلة في الأمعاء وتثبيط امتصاصها ومن ثم خفض مستواه محفزاً للكبد لتحويل الكوليسترول إلى أحماض صفراوية (Sauvaire *et al.*, 1996).

ويتفق ذلك مع ما أشار إليه عبد الرحمن، صائب يونس (1995)، الكاكي، إسماعيل صالح (1999) وقد يعود السبب إلى احتواء أوراق الزيتون على الراتنجات (Resin) (Cheij, 1984) التي تعمل أيضاً بنفس الآلية على تقليل امتصاص أملاح الصفراء من الأمعاء وبذلك يزداد تحويل الكوليسترول في الكبد إلى أملاح صفراء جديدة بشكل ينعكس على انخفاض مستواه في الدم، أو ربما تعود إلى احتوائه على الأحماض الدهنية غير المشبعة التي تقوم بمهمة خفض مستوى الكوليسترول في الدم (Sauvaire *et al.*, 1996). ومما هو جدير بالذكر احتواء أوراق الزيتون على نسبة مرتفعة من الفلافونيدات وعلى رأسها الأوليوروبين وهيدروكسي تيروزول تساهم بشكل كبير في امراضية الداء السكري، فتعمل على استعادة اتزان عمليات الأكسدة (Jemai *et al.*, 2009). بالإضافة لاحتوائها على الروتين (rutin)، وكاتيكين (catechin)، ولوتيولين (luteolin)، التي تمتلك تأثيرات قوية لكسح الجذور وبالتالي التقليل من الأكسدة الضارة بالجسم (Braun, 2005). وقد أكد (Bennani-Kabchi *et al.* (2000) أن تلك الخصائص المضادة للأكسدة من المحتمل أن تساهم بتأثيرها كمضاد لارتفاع ضغط الدم وتكون مسؤولة عن التأثيرات الخافضة للكوليسترول ويرجع ذلك لقدرتها على خفض الدهون منخفضة الكثافة (LDL-C) (Low-Density Lipoproteins) والدهون قليلة الكثافة جداً (VLDL-C) (Very Low-Density Lipoproteins). وقد بين (Al-qarawi *et al.* (2002) أن الخلاصة المحضرة من أوراق الزيتون تمتلك خصائص منشطة لإفراز الغدة الدرقية وهذا أيضاً قد يفسر تأثيرها الخافض للدهون حيث انخفضت مستويات الدهون بما فيها الكوليسترول، وذلك مع زيادة إفراز الهرمونات الدرقية وبخاصة ثلاثي يود التيروسين والتيروكسين.

#### الاستنتاجات والتوصيات

- 1- نستنتج مما سبق إمكانية استخدام الخلاصة الكحولية لأوراق الزيتون كعقار دوائي ذو منشأ نباتي يلعب دوراً فعالاً في التقليل من مستوى السكر والكوليسترول في الدم وخاصة عند المصابين بداء السكري.
- 2- توسيع البحث مستقبلاً من أجل الحصول على مردودات اقتصادية عن طريق محاولة التأثير على استقلاب السكريات وربط ذلك مع التغيرات الحاصلة في استقلاب البروتينات والدهون.

#### المراجع

- الكاكي، إسماعيل صالح (1999): أثر بعض النباتات المخفضة لسكر الدم في بيروكسيده الدهن ومستوى الكلوتاثيون وبعض الجوانب الكيمياوية الحياتية في ذكور الأرانب السليمة والمصابة بداء السكر التجريبي (أطروحة دكتوراه)، كلية العلوم، جامعة الموصل.
- الزبيدي، زهير نجيب؛ بيان، هدى عبد الكريم؛ فليح، فارس كاظم (1997): دليل العلاج بالأعشاب الطبية العراقية. شركة أب للطباعة الفنية المحدودة، بغداد، العراق.
- سلطان، خالد حساني؛ عبد الرحمن، صائب يونس (2007): تأثير المستخلص المغلي لأوراق الزيتون في بعض الصفات الفسلجية والإنتاجية في الأرانب. مجلة زراعة الرافدين. 34(4). 74-81.
- عبد الرحمن، صائب يونس والقطان، منتهى محمود (2002): تأثير المعاملة بأوراق الزيتون في أيض الكربوهيدرات في الأرانب. مجلة علوم الرافدين، المجلد (13)، العدد (2).
- عبد الرحمن، صائب يونس (1995): تأثير التجويع وداء السكري التجريبي على مستوى مانعات الأكسدة وزناخة الدهن في الجرذان. (أطروحة دكتوراه)، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.

REFERENCES

- Al-azzawie, H.S. and Alhamdani, M.S. (2005):* Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life sciences.* 78: 1371–1377.
- Al-hussary, N. (1993):* Effect of Fenugreek seeds decoction on blood glucose, cholesterol and triglycerides levels in normal and alloxan diabetic rabbits. *Iraqi Journal Veterinary medicine.* 1(6): 102-105.
- Al-qarawi, A.A.; Aldamegh, M.A. and Elmougy, S.A. (2002):* Effect of freeze dried extract of *Olea europaea* on the pituitary–thyroid axis in rats. *Phytother. Res.* 16: 286–287.
- Ananthan, R.; Latha, M.; Ramakumar, K.M.; Pari, L. and Narmatha, B. (2003):* Effect of *Gymnema montanum* leaves on serum and tissue lipids in alloxan diabetic rats, 4: 183-189.
- Andreadou, I.; Iliodromitis, E.K.; Mikros, E.; Constantinou, M.; Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A.L.; Kamber, E.; Tsantili-Kakoulidou, A. and Th Kremastinos, D. (2006):* The Olive Constituent Oleuropein Exhibits Anti-Ischemic, Antioxidative, and Hypolipidemic Effects in Anesthetized Rabbits. *J. Nutr.*, 136: 2213-2219.
- Alarcon-Aguilar, F.J.; Roman-Ramos, R.; Flores-Saenz, J.L. and Aguirre- Garcia, F. (2002):* Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother Res.*, 16: 383–386.
- Bennani-Kabchi, N.; Fdhil, H.; Cherrah, Y.; El Bouayadi, F.; Kehel, L. and Marquie, G. (2000):* Therapeutic effect of *Olea europea* var *oleaster* leaves on carbohydrate and lipid metabolism in obese and prediabetic sand rats *Psammomys obesus*. *Ann. Pharm.* 58: 271–277.
- Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuno, A. and Del Rio, J.A. (2000):* Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 68: 457-462.
- Braun, L. (2005):* Olive-leaf extract. *The Journal of Complementary Medicine.* p: 69-73.
- Briante, R.; Patumi, M.; Terenziani, S.; Bismuto, E.; Febbraio, F. and Nucci, R. (2002):* *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4934-4940.
- Brown, D. (2001):* Encyclopedia of herbs Dorling. Kindersley limited, 294-295.
- Cheij, R. (1984):* McDonald Encyclopedia of Medical plants. McDonald and Co., (publishers) Ltd, London, pp.: 209: 309-313.
- Dekanski, D.; Janicijevic-Hudomal, S.; Tadic, V.; Markovic, G.; Arsic, I. and Mitrovic, D.M. (2009):* Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *Serb. Chem. Soc.*, 74 (4): 367-377.
- Deshmuk, S. and Brole, M. (1975):* Studies on insecticidal properties of indigenous plant products. *G. Ethropharmacol.* 37: 11-18.
- Dimitrova, S.S.; Georgive, I.P.; Kanelov, I.N.; Iliev, Y.I. and Taner, S.I. (2008):* Intravenous glucose tolerance test and glucose pharmacokinetic in rabbits. *Bulg. J. Vet. Med.* 11(3): 161-169.
- Dubey, G.P.; Dixit, S.P. and Alok, S. (1994):* Alloxan-induced Diabetes in Rabbits and Effect of a Herbal Formulation D-400 *Indian Journal of Pharmacology.* (26): 225-226.
- Eidi, A.; Eidi, M. and Darzil, R. (2009):* Antidiabetic Effect of *Olea europaea* L. in Normal and Diabetic Rats *Phytother. Res.*, 23: 347–350.
- Etuk, E.U. (2010):* Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric. Biol. J.N. Am.* 1(2): 130-134.
- Fehri, B.; Aiache, J.M.; Memmi, A.; Korbi, S.; Yacoubi, M.T.; Mad, S. and Lamasion, J.L. (1994):* Hypotension, hypoglycemia and hypouricemia recorded after repeated administration of aqueous leaf extract of *Olea europaea* L. *J. Pharm-Belg.* 49(2): 101-108.



- Geo, T.; Grossberg, M.D. and Fox, B. (2007):* The essential herb-drug-vitamin interaction guide, 355-356.
- Gonzalez, M.; Zarzuelo, A.; Gamez, M.J.; Utrilla, M.P.; Jimenez, J. and Osuna, I. (1992):* Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med.* 58: 313-315.
- Hashemi, M.; Dostar, Y.; Rohani, S.R.; Azizi Saraji, A.R. and Bayat, M. (2009):* Influence of Aloxanes on the Apoptosis of Pancreas B-Cells of Rat. *World Journal of Medical Sciences.* 4(2): 70-73.
- Jemai, H.; El-Feki, A. and Sayadi, S. (2009):* Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J. Agric Food Chem.*, 57(19): 8798-804.
- Jouad, H.; Haloui, M.; Rhiouani, H.; El Hilaly, J. and Eddouks. M. (2001):* Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North Center Region of Morocco (fez-Boulemane). *J Ethnopharmacol.* 77: 175-182.
- Kamtchouing, P.; Kahpui, S.M.; Djomeni, P.D.; T'edong, L.; Asongalem, E.A. and Dimoa, T. (2006):* Anti-diabetic activity of methanol methylene chloride stem bark extracts of *Terminalia superba* and *Canarium schweinfurthii* on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 104: 306-309.
- Katsumata, K. and Katsumata, Y. (1990):* The potentiating effect of the simultaneous administration of tolbutamide, glibenclamide, and gliclazide on the development of alloxan – induced diabetes in rats. *Hom. Metab .Res*, 22: 51-52.
- Khudiar, K.K. (2000):* The role of aqueous extract of olive (*Olea europaea*) leaves and garlic (*Allium sativum*) in a meliorating the effects of experimentally induced atherosclerosis in rats. PH.D. Thesis, College of veterinary medicine. University of Baghdad.
- Lalas, S.; Athanasiadis, V.; Gortzi, O.; Bounitsi, M.; Giovanoudis, I.; Tasknis, J. and Bogiatzis, F. (2011):* Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry.* 127: 1521-1525.
- Lenich, A.C.; Hobanian, A.V.; Brecher, P. and Zannis, V.I. (1990):* Effect of dietary cholesterol and alloxan diabetes on tissue cholesterol and apo lipoprotein E m RNA levels in rabbit. *J. lipids Res.* 32 (3): 432-438.
- Lenzen, S.; Brunig, H. and Munster, W. (1992):* Effect of alloxan and ninhydrin on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport. *Mol. Cell. Biochem*, 118: 141-151.
- Maechler, P.; Wolheim, C.B.; Bentzen, C.L. and Niesor, E. (1993):* Importace of exogenous cholesterol in diabetic rats: effect of treatment with insulin or with an acyl- COA: cholesterol acyl transferas inhibition. *Ann. Nutr. Metab.* 37 (4): 199-209.
- Mahesar, H.; Bhutto, M.A.; Khand, A.A. and Narejo, N.T. (2010):* Garlic used as an alternative medicine to control diabetic mellitus in alloxan-induced male rabbits. *Pak. J. Physiol.* 6(1): 39-41.
- Montvale, N.J. (2000):* Physician's desk references for herbal medicine. Medical economics company, p.556.
- Okamoto, H. (1985):* Molecular basis of experimental diabetes: Degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells of islet of Langerhans. *BioEssay.* 2: 15-21.
- Omar, S.H. (2010):* Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.*, 78: 133-154.
- Park, B.; Rho, H.; Park, J.; Cho, C.; Kim, J.; Chung, H. and Kim, H. (1995):* Protective mechanism of glucose against alloxan-induced pancreatic  $\beta$ -cells damage. *Biochem Biophys Res. Commun.* 210: 1-6.

- Petit, P.; Sauvarie, Y.; Ponsin, G.; Manteghetti, M.; Fave, A. and Ribes, G. (1993):* Effect of a fenugreek seed extract on feeding behaviour in rat: Metabolic – indocrine correlates Pharmacol. Biochem. Behav., 45: 369-374.
- Prince, D.S.; Kamalakkannan, N. and Menon, V.P. (2004):* Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of alcoholic extract of *Syzygium cumin* seeds in alloxan induced diabetic albino rats. J. Ethnopharmacol. 91(203): 209-213.
- Radhika, R.; Kumari, K. and Sudarsanam, D. (2010):* Antidiabetic activity of *Rheum emodi* in Alloxan induced diabetic rats. International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR). 1(8): 296-300.
- Rao, B.K.; Kesarulu, M.M.; Giri, R. and Apparao, C. (1999):* Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica cymbalaria* Hook fruit powder in alloxan diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 67(1): 103-109.
- Sauvaire, Y.; Baissac, Y.; Leconte, O.; Petit, P. and Ribes, G. (1996):* Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties. Adv. Exp. Med. Biol. 405: 37-46.
- Said, O.; Fulder, S.; Khalil, K.; Azaizeh, H.; Kassis, E. and Saad, B. (2008):* Maintaining a physiological blood glucose level with ‘glucoselevel’, a combination of four anti-diabetes plants used in the traditional arab herbal medicine. ECAM. 5(4): 421-428.
- Schoenfelder, T.; Cirimbelli, T.M. and Citadini-Zanette, V. (2006):* Acute effect of *Trema micrantha* on serum glucose levels in normal and diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 107: 456-459.
- Sharma, S.B.; Nasir, A.; Probhu, K.M.; Murthy, P.S. and Dev, G. (2003):* Hypoglycemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seed of *Eugenia jambolana* in alloxan – induced diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol. 85 (2-3): 201-206.
- Satoa, H.; Geneth, C.; Strehlea, A.; Thomasa, C.; Lobsteinc, A.; Wagnerb, A.; Mioskowskib, C.; Auwerxa, J. and Saladind, R. (2007):* Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea* Biochemical and Biophysical Research Communications. 362(4): 793-798.
- Szkudelski, T. (2001):* The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rats pancreas. Physiol. Res. 50: 536-546.
- Takasu, N.; Aswan, T.; Komiya, I.; Nagasawa, Y. and Yamada, T. (1991):* Alloxan-induced DNA strand breaks in pancreatic islets, evidence for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an intermediate. Biol.Chem. 266(4): 2112-2114.
- Tiedge, M.; Lortz, S.; Drinkgren, J. and Lenzen, S. (1997):* Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin producing cells. Diabetes. 46: 1733-1742.
- Trichopoulou, A.; Kouris-Blazos, A.; Wahlqvist, M.L.; Gnardellis, C.; Lagiou, P.; Polychronopoulos, E.; Vassilakou, T.; Lipworth, L. and Trichopoulos, D. (1995):* Diet and overall survival in elderly people. British medical journal. 311: 1457-1460.
- Tshikalange, T.E.; Meyer, J.J. and Hussein, A.A. (2005):* Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted disease. J. Ethnopharmacol. 96 (3): 515-9.
- Verspohl, E.J. (2002):* Recommended testing in diabetes research. Planta Med., 68: 581-590.
- Wilson, G.L.; Patton, N.J.; McCord, J.M.; Mullins, D.W. and Mossman, B.T. (1984):* Mechanisms of streptozotocin and alloxan – induced damage in rat B cells. Diabetologies. 27 (6): 587- 591.
- Wunwisa, K. and Areeya, K. (2005):* Antimicrobial properties of the traditional flower vegetable extracts. Au J.T. 2: 71-74.