

بررسی اثر هیپوگلیسمیک عصاره الکلی برگ گیاه اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus* Labill.) در موش‌های صحرایی

نر بالغ سالم و دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین

اکرم عیدی^۱، مریم عیدی^۲، محمدهادی گیویان راد^۳، نسیم عباسپور^۴

^۱ دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

^۲ دانشیار فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین

^۳ استادیار شیمی، گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

^۴ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

سابقه و هدف: اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus* L.) به دلیل فعالیت‌های بیولوژیکی مانند آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدویروسی در طب سنتی کاربرد دارد. در این مطالعه اثر هیپوگلیسمیک عصاره الکلی برگ گیاه اکالیپتوس در موش‌های صحرایی نر بالغ سالم و دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین بررسی شد.

روش بررسی: در پژوهش تجربی حاضر، به منظور تعیین سطح گلوکز و انسولین سرم، عصاره الکلی برگ گیاه اکالیپتوس با مقادیر ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۱ روز بصورت خوراکی به موش‌های صحرایی نر سالم و دیابتی شده توسط داروی استرپتوزوتوسین تیمار گردید. مقایسه‌ای بین اثر عصاره الکلی برگ گیاه اکالیپتوس و داروی متداول ضد دیابتی، گلی‌بن‌کلامید (با دوز ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن) انجام شد.

یافته‌ها: تیمار خوراکی عصاره الکلی برگ گیاه اکالیپتوس فقط در موش‌های دیابتی شده باعث کاهش معنی‌داری بر میزان گلوکز و افزایش انسولین سرم شد و در موش‌های سالم چنین تاثیری نداشت. عصاره همانند داروی گلی‌بن‌کلامید موجب کاهش معنی‌داری بر میزان گلوکز و افزایش معنی‌داری بر میزان انسولین سرم شد.

نتیجه‌گیری: این گیاه با داشتن اثرات هیپوگلیسمیک و به دلیل عوارض جانبی کمتر در مقایسه با داروهای سنتتیک در درمان دیابت توصیه می‌گردد، هر چند مکانیسم عمل آن نامشخص است و احتیاج به تحقیقات بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی بیشتری دارد.

واژگان کلیدی: اکالیپتوس، هیپوگلیسمیک، دیابت، موش صحرایی.

مقدمه

اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus* L.) از خانواده Myrtaceae درختی مرتفع با چوبی سخت و بادوام است. پوست ساقه آن

رنگ قهوه‌ای، مایل به زرد دارد و به سهولت از ساقه جدا می‌شود. برگ‌ها در شاخه‌های جوان وضع متقابل، افقی و تقریباً عاری از دم‌برگ دارند. برگ‌ها بیضوی، دراز و مدور در قسمت قاعده پهنک است. رنگ برگ‌ها در آغاز، سبز مایل به آبی است ولی به تدریج به رنگ سبز مایل به سفید در آمده و مومی می‌گردد. شاخه‌های حامل این نوع برگ‌ها ظاهر چهارگوش و بال‌دار دارد (۱). گیاه اکالیپتوس دارای تنوعی از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دکتر اکرم عیدی

(email: akram_eidi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۹/۱۳

فلوروگلوکوسینول و تائین‌ها می‌باشد. بعضی از این ترکیبات دارای فعالیت‌های بیولوژیک از جمله آنتی‌اکسیدان (۲)، ضدباکتری (۳) و ضدقارچی (۴) می‌باشند.

دیابت قندی شایع‌ترین بیماری غدد درون ریز بوده که در جریان آن بعلت فقدان نسبی یا کامل انسولین و یا کاهش حساسیت بافت‌های هدف نسبت به تاثیرات آن اختلالاتی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها صورت می‌گیرد. به دلیل اختلال در ترشح و تاثیر انسولین، هیپرگلیسمی ایجاد می‌شود که در دراز مدت تاثیرات وسیعی بر تمامی اندام‌های بدن می‌گذارد که از آن جمله می‌توان به درگیری عروق کوچک و ضخیم شدن غشاء پایه مویرگ‌ها، درگیری عروق بزرگ، آترواسکلروز سریعاً پیشرونده، درگیری اعصاب سوماتیک و خودکار، کاهش مقاومت نسبت به عفونت‌ها و در نتیجه بروز عوارض دراز مدت بینائی، کلیوی، عصبی و عروق خونی را نام برد (۵). شیوع بالای دیابت و مشکلات فردی و اجتماعی حاصل از آن از یک سو و لزوم احیای طب سنتی و شناسایی اثرات آنتی‌دیابتیک گیاهان دارویی موجود در طبیعت که دارای آثار درمانی با ارزشی هستند، ما را بر آن داشت تا اثر هیپوگلیسمیک برگ گیاه اکالیپتوس را مورد مطالعه قرار دهیم. در تحقیق حاضر به منظور تعیین اثر هیپوگلیسمیک برگ گیاه اکالیپتوس، عصاره الکلی برگ گیاه به موش‌های صحرایی نر سالم و دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین تیمار گردید و میزان گلوکز و انسولین سرم در حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت و همچنین مقایسه‌ای بین اثر هیپوگلیسمیک عصاره الکلی برگ گیاه و داروی متداول ضددیابتی گلی‌بن‌کلامید صورت گرفت.

مواد و روشها

در پژوهش تجربی حاضر، برگ گیاه اکالیپتوس جمع‌آوری گردیده و پس از شناسایی از نظر تاکسونومیکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در سایه خشک شده و توسط آسیاب مکانیکی جهت تهیه عصاره گیاه به پودر تبدیل گردید. پودر خشک در کیسه‌های نایلونی تا زمان آزمایش در جای خنک نگهداری شد.

برای آماده‌سازی عصاره، پودر برگ گیاه اکالیپتوس با اتانول ۸۰ درصد مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل در دستگاه سوکسله قرار داده شد و عصاره بدست آمده با استفاده از دستگاه Rotary خشک گردید.

موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد Wistar با محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در اتاق حیوانات با درجه حرارت کنترل شده 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده، آب و غذای کافی همواره در دسترس آنها قرار داشت.

جهت القا دیابت، موش‌های صحرایی به صورت درون صفاقی، استرپتوزوتوسین (Pharmacia & Upjohn, USA) را با دوز ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند. علائم دیابت شامل کاهش وزن، پرنوشی و پرادراری پس از گذشت ۷-۵ روز آشکار گردید. جهت اطمینان بیشتر، میزان قند خون حیوانات از طریق خون‌گیری از سینوس رترواریتال از گوشه داخلی چشم اندازه‌گیری شد که افزایش قند خون به میزان بیش از ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر نشان‌دهنده دیابتی‌شدن حیوانات بود.

عصاره گیاهی، داروی گلی‌بن‌کلامید و آب مقطر به صورت خوراکی از طریق لوله intragastric روزانه تیمار گردید. حجم ماده تیمار شده در تمامی گروه‌ها ۱ میلی‌لیتر و مدت زمان تیمار ۲۱ روز بود. حیوانات به ۱۱ گروه تقسیم شدند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ سر به شرح زیر بود:

گروه ۱: حیوانات سالم که با آب مقطر تیمار شدند.

گروه ۲: حیوانات دیابتی که با آب مقطر تیمار شدند.

گروه‌های ۳، ۴، ۵ و ۶: حیوانات سالم که عصاره گیاهی را به ترتیب با دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

گروه‌های ۷، ۸، ۹ و ۱۰: حیوانات دیابتی که عصاره گیاهی را با دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

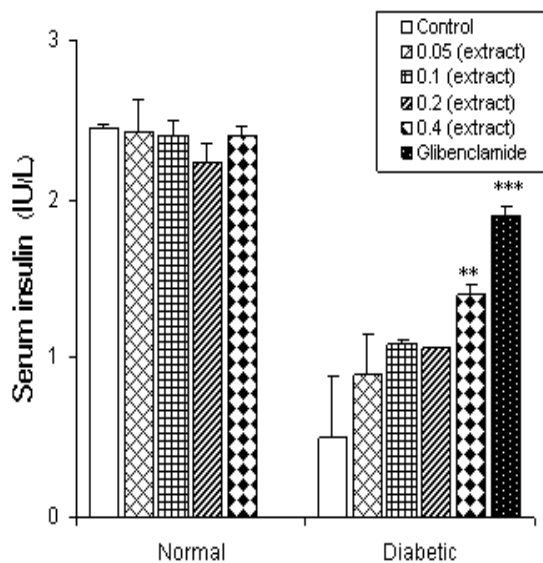
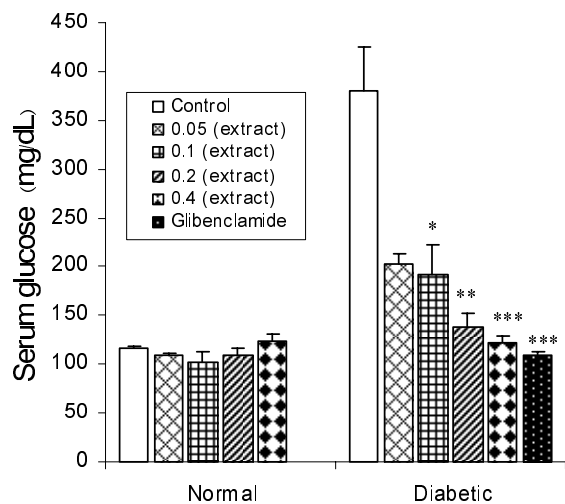
گروه ۱۱: حیوانات دیابتی که داروی گلی‌بن‌کلامید را با دوز ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت نمودند.

پس از گذشت ۲۱ روز، حیوانات با اتر بیهوش شده و نمونه‌های خون از طریق خون‌گیری از قلب جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها بلافاصله سانتریفیوژ شده و سرم آنها به دست آمد. میزان گلوکز و انسولین سرم به روش آنزیماتیک (۶) اندازه‌گیری گردید.

تمامی داده‌ها از نظر آماری، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و تست Tukey بررسی گردیدند. نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار ارائه گردید. معیار استنتاج آماری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان گلوکز سرم به صورت معنی‌داری در موش‌های دیابتی شده در مقایسه با موش‌های سالم بیشتر بود ($p < 0.001$). داروی گلی‌بن‌کلامید ($p < 0.001$) و عصاره الکی برگ گیاه اکالیپتوس با دوز ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن ($p < 0.05$) کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز سرم در موش‌های دیابتی شده ایجاد کردند، به طوری که عصاره گیاهی به صورت معنی‌داری همانند داروی گلی‌بن‌کلامید در کاهش میزان گلوکز در موش‌های دیابتی شده عمل کرد (نمودار ۱).



نمودار ۲- اثر تیمار خوراکی عصاره الکی برگ گیاه اکالیپتوس (غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گلی‌بن‌کلامید بر میزان انسولین سرم در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی شده توسط داروی استرپتوزوتوسین.

حیوانات کنترل آب مقطر دریافت نموده‌اند. هر ستون میانگین \pm خطای معیار را نشان می‌دهد. $p < 0.05^*$ ، $p < 0.01^{**}$ ، $p < 0.001^{***}$ اختلاف میزان گلوکز را از گروه کنترل دیابتی نشان می‌دهد.

بحث

یکی از مشکلات بزرگی که طب جدید با وجود امتیازهای ظاهری آن نسبت به طب سنتی با خود به ارمغان آورده، مصرف روزافزون داروهای شیمیایی است که متأسفانه روزبروز شکل حادثی به خود می‌گیرد. در رابطه با پیامدهای این مسئله دو مورد بسیار مهم قابل ذکر می‌باشد. نخست اینکه بر اثر مصرف مداوم، بی‌رویه و گاهی بدون توجه به طریقه خاص مصرف برخی داروها، به تدریج پدیده‌ای به نام خودایمنی در میکروب‌ها و ویروس‌ها ایجاد می‌شود و از این طریق تاثیر داروها را ضعیف و حتی خنثی می‌سازد و در نتیجه باعث افزایش مصرف و روی آوردن به انواع قوی‌تری از آنها می‌شود. ثانیاً اگرچه استفاده از داروهای شیمیایی در رابطه با بیماری‌های خاصی که مورد نظر است مفید واقع می‌شود، ولی مصرف طولانی و در برخی موارد حتی مقطعی آنها عوارض خاصی از خود برجا می‌گذارد که «عوارض جانبی» نامیده شده و گاهی می‌تواند از خود بیماری نیز خطرناک‌تر باشد.

دیابت بیماری مزمن، مادام‌العمر و یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز است که در بیشتر موارد به علت کاهش ترشح انسولین توسط سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس

نمودار ۱- اثر تیمار خوراکی عصاره الکی برگ گیاه اکالیپتوس (غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، و ۰/۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و گلی‌بن‌کلامید بر میزان گلوکز سرم در موش‌های صحرایی سالم و دیابتی شده توسط داروی استرپتوزوتوسین.

حیوانات کنترل آب مقطر دریافت نموده‌اند. هر ستون میانگین \pm خطای معیار را نشان می‌دهد. $p < 0.05^*$ ، $p < 0.01^{**}$ ، $p < 0.001^{***}$ اختلاف میزان گلوکز را از گروه کنترل دیابتی نشان می‌دهد.

میزان انسولین سرم در موش‌های دیابتی شده توسط داروی استرپتوزوتوسین در مقایسه با موش‌های سالم کاهش داشت. داروی گلی‌بن‌کلامید ($p < 0.001$) و عصاره الکی برگ گیاه اکالیپتوس در دوز ۰/۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن ($p < 0.001$) افزایش معنی‌داری در میزان انسولین سرم در موش‌های دیابتی شده ایجاد نمود. عصاره الکی برگ گیاه اکالیپتوس همانند داروی گلی‌بن‌کلامید افزایش معنی‌داری بر میزان انسولین سرم در موش‌های دیابتی شده را نشان داد (نمودار ۲). تیمار عصاره الکی برگ گیاه اکالیپتوس در دوزهای مختلف تغییر معنی‌داری بر میزان گلوکز (نمودار ۱) و انسولین (نمودار ۲) در موش‌های سالم ایجاد نکرد.

(سینئول)، ترینئول، الکل‌های سسکوئی‌ترین، آلدئیدهای آلیفاتیک، الکل ایزوآمیل و ترین‌ها می‌باشند (۱۴).

تحقیقات نشان داده‌اند که اثر هیپوگلیسمیک بعضی از گیاهان دارویی وابسته به تغییر در فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز و گلوکوکیناز کبد می‌باشد. همچنین بسیاری از تحقیقات دلالت بر آن دارند که تیمار با گیاهان موجب تغییر فعالیت گلوکز-۶-فسفات، گلیکوزن‌سنتاز، گلیکوزن‌فسفوریلاز، گلوکز-۶-دهیدروژناز و فسفو- فروکتوکیناز می‌گردد (۱۵، ۱۶). گزارشات اندکی در خصوص اثر کاهش دهنده عصاره برگ گیاه اکالیپتوس بر میزان قند خون در دسترس می‌باشد. عصاره برگ گیاه اکالیپتوس احتمالاً مصرف گلوکز را توسط بافت‌های محیطی تقویت می‌نماید، زیرا عصاره به صورت معنی‌داری میزان گلوکز خون افزایش یافته در حیوانات دیابتی را پایین می‌آورد. این عصاره احتمالاً موجب مهار جذب گلوکز روده‌ای نیز می‌گردد. همچنین عصاره می‌تواند از طریق افزایش آزادسازی یا عملکرد انسولین از سلول‌های بتای پانکراس که در اثر عمل استرپتوزوتوسین آسیب ندیده‌اند، عمل نماید. از طرف دیگر گزارش شده است که اکثر گیاهان با فعالیت آنتی‌دیابتی با گیرنده انسولین واکنش متقابل نداشته، بلکه عمل انسولین را با واکنش متقابل با تیروزین کیناز گیرنده انسولین تحریک می‌کنند (۱۷). انسولین یک هورمون آنابولیک می‌باشد که باعث تحریک برداشت گلوکز توسط بافت چربی و عضله شده، تبدیل گلوکز به گلیکوژن یا چربی را جهت ذخیره افزایش داده، از تولید گلوکز توسط کبد جلوگیری نموده، سنتز پروتئین را تحریک کرده و از شکستن پروتئین جلوگیری می‌کند (۶، ۱۸).

نتیجه کلی آنکه بر طبق نتایج تحقیق حاضر عصاره الکل برگ گیاه اکالیپتوس همانند داروی متداول گلی‌بن‌کلامید در کاهش میزان گلوکز و افزایش معنی‌دار میزان انسولین در موش‌های دیابتی شده عمل می‌کند، لذا می‌توان عصاره این گیاه را به عنوان داروی ضد دیابتی ایمن‌تری در نظر گرفت. هر چند تحقیق‌های بیوشیمیایی و فارماکولوژیکی بیشتری را باید جهت استفاده از آن مد نظر قرار داد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را به دلیل حمایت‌های علمی و اجرایی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ابراز می‌دارند.

ایجاد می‌گردد (۷). این بیماری با اختلالات متابولیکی و عوارض دراز مدت در چشم‌ها، کلیه‌ها، اعصاب و عروق خونی مشخص می‌شود و با اختلال وسیعی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، پروتئین‌ها، آب و الکترولیت‌ها همراه است (۸). با توجه به ضایعات متعدد و گاه کشنده‌ای که بیماری در افراد دیابتی به جای می‌گذارد، لزوم بررسی راه‌های درمان، تخفیف و پیشگیری از آن احساس می‌شود. روش‌های درمانی که در حال حاضر برای درمان بیماری دیابت در دسترس هستند، مانند تغییر رژیم غذایی و عوامل هیپوگلیسمیک خوراکی، دارای محدودیت‌هایی می‌باشند. گیاهان دارویی برای درمان دیابت قندی به طور وسیعی به ویژه در کشورهای آسیائی استفاده می‌شوند. سازمان بهداشت جهانی نیز توصیه‌هایی در مورد استفاده از این گیاهان نموده است (۹).

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که تیمار خوراکی عصاره الکل برگ گیاه اکالیپتوس پس از گذشت ۲۱ روز کاهش معنی‌داری را در میزان گلوکز و افزایش معنی‌داری را بر میزان انسولین سرم حیوانات دیابتی ایجاد می‌نماید، ولی تأثیر معنی‌داری در میزان گلوکز و انسولین سرم حیوانات سالم تیمار شده ندارد. اثر هیپوگلیسمیک عصاره مشابه عملکرد داروی گلی‌بن‌کلامید می‌باشد.

نتایج پژوهش حاضر دلالت بر آن دارند که تزریق استرپتوزوتوسین (۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) ایجاد مدل دیابتی نوع II را در موش‌های صحرایی می‌نماید، به طوری که سطح گلوکز در رت‌های دیابتی شده بطور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. استرپتوزوتوسین به عنوان عامل ضد سرطان برای القای دیابت نوع II با ایجاد دژنره شدن و نکروز سلول‌های بتای پانکراس در بسیاری از مدل‌های حیوانی به کار می‌رود (۱۰). استرپتوزوتوسین با وارد نمودن آسیب به غشاء سلول‌های بتای پانکراس، قطعه قطعه نمودن DNA و واکنش با آنزیم‌هایی مانند گلوکوکیناز موجب افزایش سطح گلوکز در حیوانات می‌گردد (۱۱).

ترکیبات شیمیایی اصلی گیاهانی که موجب کاهش قند خون می‌شوند، گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، گلیکان‌ها، ترین‌ها، موسیلاژها، پلی‌ساکاریدها، روغن‌ها، ویتامین‌ها، ساپونین‌ها، گلیکو پروتئین‌ها، پپتیدها، آمینواسیدها و پروتئین‌ها می‌باشند (۱۲). Alarcon و همکارانش در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که سسکوئی‌ترین‌ها در کاهش قند خون موش‌های دیابتی شده موثر هستند (۱۳). برگ‌های اکالیپتوس حاوی اکالیپتول

REFERENCES

1. Zargari A, ed. Medicinal plants. Tehran: Tehran university Publication; 1990. [In Persian]
2. Amakura Y, Umino Y, Tsuji S, Ito H, Hatsno T, Yoshida T, et al. Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. *Food Chemistry* 2002; 77: 47-56.
3. Hou AJ, Liu YZ, Yang H, Lin ZW, Sun HD. Hydrolysable tannins and related polyphenols from *Eucalyptus globulus*. *J Asian Nat Prod Res* 2000; 2: 205-12.
4. Takasaki M, Konoshina T, Fujitani K, Yoshida S, Nishimura H, Tokuda H, et al. Inhibitors of skin-tumor promotion. VIII. Inhibitory effects of euglobals and their related compounds on Epstein-Barr virus activation. *Chem Pharmacol Bull* 1990; 38: 2723-39.
5. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, eds. Harrison's principles of internal medicine. 15th edition. Philadelphia: McGraw-Hill; 1998. p.2020-80.
6. Carl A, Burtis R, Ashwood E. Tietz text book of clinical chemistry; W.B.Saunders Company Third Edition; 1999.
7. Williams G, Pickup JC, eds. Handbook of diabetes. 2nd edition. New York: Blackwell Science; 2000. p. 48-60.
8. American Diabetes Association. Clinical practice recommendation. *Diab Care* 1997; 20: S1-70.
9. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. Technical report series 646. Second report. Geneva: World Health Organization; 1980.
10. Merzouk H, Madani S, Chabane D. Time course of changes in serum glucose, insulin, lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin- induced diabetes. *Clin Sci* 2000; 98: 21-30.
11. Sander S. Abstracts of Uppsala dissertations from the faculty of medicine. Sweden: University of Uppsala; 1983.
12. Handa SS, Chawla AS. Hypoglycemic plants- review. *Fitotrapia* 1989; 60: 195-98.
13. Alarcon FJ. Hypoglycemic activity of root water decoction, sesquiterpenoids and one polysaccharide. *J Ethnopharmacol* 2000; 69: 207-15.
14. Morton JF. Atlas of medicinal plants of Middle America. Bahamas to Yucatan. Springfield, IL: C.C. Thomas; 1981.
15. Bopanna KN, Kannan J, Gadgil S, Balaraman R, Rathod SP. Antidiabetic and antihyperlipedemic effects of seed kernel powder on alloxan-diabetic rabbits. *Indian J Pharmacol* 1997; 29: 162-67.
16. Lee HA, Kwon SO, Lee HB. Hypoglycemic action of components from red ginseng: (I) investigation of the effect of ginsenosides from red ginseng Qu enzymes related to glucose metabolism in cultured rat hepatocytes. *Korya Insam Hakhoechi (Korean)* 1997; 21: 174-86.
17. Verspohl EJ. Recommended testing in diabetes research. *Planta Medica* 2002; 68: 581-90.
18. Caroll P, Matz R. Uncontrolled diabetes mellitus in adults: experience in treating diabetic ketoacidosis and hyperosmolar non-ketotic coma with low-dose of insulin and a uniform treatment regimen. *Diab Care* 1983; 6: 579-84.