Archive of SID

دانشور
پزشکی

اثر تجویز درازمدت عصاره آبی برگ شنبلیله *(Trigonella foenum-graecum)* بر تون پایه و فعال آئورت سینه‌ای در موش صحرایی دیابتی

نویسندگان: دکتر مهرداد روغنی[*1]، دکتر توراندخت بلوچ‌نژادمجرد[2] و دکتر محمدرضا واعظ‌مهدوی[1]

۱- استادیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی
۲- دانشیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران
* نویسنده مسئول: Email: mehjour@yahoo.com

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال دوازدهم - شماره ۵۸
شهریور ۱۳۸۴

تاریخ وصول: ۸۳/۱۰/۲۹
تاریخ پذیرش: ۸۴/۱/۲۴

چکیده

هدف: با توجه به اثر ضددیابتی دانه و برگ شنبلیله، در تحقیق حاضر اثر عصاره آبی برگ شنبلیله بر تون پایه و فعال آئورت سینه‌ای در مدل تجربی دیابت قندی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به این منظور، موش‌هایی صحرایی نر از نژاد ویستار به گروه‌های کنترل، کنترل تحت تیمار با عصاره آبی برگ شنبلیله، دیابتی، و دیابتی تحت درمان با عصاره تقسیم شدند. عصاره شنبلیله در یکی از دوزهای ۲۰۰ mg/Kg و ۱۰۰ به فرم داخل صفاقی و یک روز در میان سه روز پس از شروع بررسی به مدت دو ماه تجویز گردید. مقادیر وزن و گلوکز سرم در هفته قبل بررسی و در هفته‌های چهارم و هشتم پس از آن تعیین شد و پاسخگویی حلقه‌های آئورتی در دو حالت پایه و فعال در پایان دو ماه با استفاده از بسط بافت ایزوله مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

نتایج: نتایج بررسی نشان داد که هر چند تیمار با عصاره برگ شنبلیله در هر دو دوز هیچ‌گونه تغییر معنادار در میزان تون پایه در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره در مقایسه با گروه دیابتی ایجاد نمی‌کند، ولی میزان تون فعال القا شده بر اثر اضافه کردن نورآدرنالین به حمام بافتی در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره (۲۰۰ mg/Kg) به‌طور معنادار از گروه دیابتی کم‌تر است ($p<0.01$).

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طور خلاصه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تیمار موش‌های دیابتی با عصاره آبی برگ شنبلیله در دراز مدت به‌صورت وابسته به دوز، موجب تخفیف پاسخگویی انقباضی آئورت سینه‌ای به آگونیست اختصاصی نورآدرنالین می‌گردد و تون پایه عروقی در موش‌های دیابتی تحت تأثیر این تیمار قرار نمی‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: برگ شنبلیله، دیابت قندی، پاسخگویی انقباضی، آئورت سینه ای، موش صحرایی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری دیابت قندی در زمره شایع‌ترین بیماری‌های سیستم غدد درون‌ریز بدن محسوب شده که شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش خواهد یافت [۱]. هر چند در حال حاضر، درمان اصلی و مؤثر برای این بیماری ناتوان‌کننده، استفاده از انسولین و عوامل هیپوگلیسیمیک است، ولی این ترکیبات دارای عوارض نامطلوب متعدد بوده، در دراز مدت بر جریان‌های ایجادکننده عوارض ناتوان‌کننده دیابت از جمله مشکلات عروقی ناشی از آن تأثیر ندارند [۲]. با توجه به افزایش دانش بشری در مورد هتروژنیته تنوع این بیماری، نیاز به یافتن ترکیبات مؤثر در درمان دیابت با عوارض جانبی کم‌تر شدیداً احساس می‌گردد [۳]. گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها، اگر چه از دیر باز در درمان دیابت قندی و عوارض ناشی از آن مطرح بوده‌اند، ولی در مورد اثر بخشی قطعی بسیاری از آن‌ها تاکنون شواهد تحقیقاتی و معتبر یافت نشده است [۴]. لذا با توجه به اثر هیپوگلیسمیک و هیپولیپیدمیک عصاره الکلی دانه شنبلیله [۵] و وجود شواهد متعدد مبنی بر اثر هیپوگلیسمیک عصاره آبی برگ شنبلیله [۶و۷] و در نظر گرفتن این موضوع که دیابت قندی در دراز مدت با عوارض عروقی جدی همراه است [۸] در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا اثر تجویز دراز مدت عصاره آبی برگ شنبلیله را بر تون پایه و فعال حلقه‌های آئورت سینه‌ای موش صحرایی با استفاده از بساط بافت ایزوله در مدل تجربی دیابت قندیِ القا شده توسط استرپتوزوسین مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش کار

برای تهیه عصاره آبی برگ شنبلیله، پس از خریداری گیاه در خرداد ماه و تأیید علمی و سیستماتیک آن توسط بخش گیاه شناسی دانشگاه شهید بهشتی، برگ‌های سبز و تازه آن جدا و شسته شده، در در درجه حرارت اتاق در سایه خشک گردیدند. ۱۰۰ گرم از پودر برگ خشک شده به یک لیتر آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه اضافه شد. سپس مخلوط به‌دست آمده ۳ باز از میان صافی رد و مایع به‌دست آمده روی بن‌ماری خشک گردید تا نهایتاً عصاره عسلی (۶۷ درصد) به‌دست آمد. سپس عصاره حاصل به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. ضمناً قبل از تجویز آن به حیوان، غلظت مناسبی از عصاره در محلول سالین فیزیولوژیک استریل تهیه شد.

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار (Wistar) (انستیتو پاستور، تهران) در محدوده وزنی ۲۷۵-۲۲۵ در شروع بررسی استفاده گردید. تمام حیوانات در آزمایشگاه حیوانات دانشکده پزشکی در دمای ۲۲-۲۰ °C در گروه‌های ۴-۳ تایی در هر قفس قرار داده شدند. ضمناً حیوانات آزادانه به آب لوله کشی و غذای مخصوص موش دسترسی داشتند. به‌منظور حصول حالت سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات به انجام رسید.

مدل دیابت قندی نوع ۱ (دیابت وابسته به انسولین) در موش صحرایی نر با یک بار تزریق داخل صفاقی STZ به میزان ۶۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن ایجاد گردید و از سرم فیزیولوژی به‌عنوان حلال STZ استفاده شد و ۴۸ تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق، سطح گلوکز سرم با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اکسیداز اندازه‌گیری شد. ملاک دیابتی بودن حیوان، میزان گلوکز سرم بالای ۲۵۰ mg/dl بود. در این تحقیق، حیوانات به شش گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل (n=10)، گروه کنترل تحت تیمار با عصاره آبی برگ شنبلیله در دو دوز ۲۰۰ mg/Kg و ۱۰۰ به‌صورت یک روز در میان (n=۱۶)، گروه دیابتی که داروی استرپتوزوتوسین را به میزان ۶۰ mg/Kg حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد به‌طور داخل صفاقی دریافت کرده و به‌صورت یک روز درمیان به مدت دو ماه هم حجم گروه‌های دیگر از محلول سالین فیزیولوژیک دریافت کرد (n=۱۰)، و گروه دیابتی تحت درمان با عصاره آبی برگ شنبلیله (n=۱۶) که عصاره را

www.SID.ir

Archive of SID

سه روز پس از دیابتی شدن در دو دوز ۲۰۰ mg/Kg و ۱۰۰ به‌طور داخل صفاقی و یک روز در میان به مدت دو ماه دریافت کرد. پارامترهای مورد بررسی در این تحقیق، میزان وزن حیوان و میزان گلوکز سرم در هفته قبل از بررسی و در طی هفته چهارم و هشتم پس از بررسی بود. به‌علاوه، پاسخگویی حلقه‌های آئورت سینه‌ای در دو حالت پایه و فعال در پایان دو ماه با استفاده از بساط بافت ایزوله به شرح زیر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت:

پس از گذشت دو ماه، موش‌ها با استفاده از اتر بیهوش شده، با باز کردن قفسه سینه، آئورت سینه‌ای جدا شد و در داخل محلول کربس -که به‌طور مداوم بداخل آن گاز کربوژن دمیده می‌شد- قرار گرفت. ترکیب شیمیایی محلول کربس مورد استفاده در تمام آزمایش‌ها به قرار زیر بود (بر حسب میلی مولار):

NaCl ۱۱۸/۵، KCl ۴/۷۴, $CaCl_2$ ۵/۲, $MgSO_4$ ۱/۱۸, KH_2PO_4 ۱/۱۸، $NaHCO_3$ ۲۴/۹، Glucose ۱۰

در داخل محلول کربس سرد، آئورت به دقت از بافت پیوندی اطراف پاک و سپس به حلقه‌هایی به طول حدوداً ۴ میلی‌متر تقسیم می‌گردید. برای حصول اطمینان از سلامت آندوتلیوم، پس از ایجاد انقباض با غلظت 10^{-6} مولار نورآدرنالین، استیل‌کولین با غلظت 10^{-5} مولار به حمام بافت اضافه می‌شد. برای ثبت پاسخگویی حلقه‌های آئورتی، آن‌ها به کمک سیم‌های پلاتینی L شکل که به موازات هم قرار می‌گرفتند از یک طرف به قلاب شیشه‌ای و از طرف دیگر به ترانس دیوسر ایزومتریک F-60 متصل می‌شدند. در این بررسی، کشش استراحتی (Resting tension) اعمال شده به حلقه‌های آئورتی ۲ گرم بود. پس از اعمال این کشش، ۶۰ تا ۹۰ دقیقه به بافت اجازه داده می‌شد تا وضعیت ثابت پیداکند. محلول کربس داخل حمام بافت نیز هر ۳۰ دقیقه تعویض می‌شد. پس از حصول حالت تعادل، میزان تون پایه حلقه آئورتی در هر گروه اندازه‌گیری شد و سپس بافت در معرض غلظت‌های افزایش یابنده نورآدرنالین (10^{-9} تا 10^{-4} مولار) قرار گرفت. برای ثبت و آنالیز داده‌ها نیز از نرم‌افزار فیزیوگراف ۱ (Physiograph I) (شرکت بهینه آرمان، تهران) استفاده گردید. پاسخ انقباضی در تمامی بررسی‌ها به‌صورت گرم به ازای واحد سطح آئورت g/mm^2 گزارش گردید.

از نظر آماری، تمامی نتایج به‌صورت میانگین ± خطای معیار (Mean ± S.E.M.) بیان گردید. برای مقایسه نتایج هر پارامتر در هر یک از گروه‌ها، قبل و بعد از بررسی از آزمون آنووا با اندازه‌گیری مکرر (Repeated measure ANOVA) و برای مقایسه گروه‌ها با هم در هر یک از پریودهای زمانی از آزمون آنووا یکطرفه (One-way ANOVA) و تست توکی (Tukey's Post-hoc test) استفاده گردید. به‌علاوه سطح معنادار $P<0.05$ برای تمامی آنالیزها در نظر گرفته شد.

نتایج

از نظر وزن حیوان، در هفته قبل از بررسی، هیچ‌گونه تفاوت معنادار بین گروه‌ها یافت نشد. به‌علاوه، در موش‌های دیابتی درمان نشده، یک کاهش معنادار ($P<0.01$) در وزن در هفته‌های چهارم (کاهش ۲۱ درصد) و هشتم (کاهش ۲۶ درصد) نسبت به هفته قبل از بررسی مشاهده گردید. در مورد گروه‌های کنترل و کنترل تحت تیمار با دو دوز عصاره آبی برگ شنبلیله نیز افزایش وزن در هفته‌های چهارم و هشتم پس از بررسی نسبت به هفته قبل از بررسی مشاهده گردید. گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره شنبلیله نیز مشابه گروه دیابتی درمان نشده، کاهش معنادار وزن را در هفته‌های چهارم و هشتم در مقایسه با هفته قبل از بررسی نشان دادند؛ هر چند که این کاهش در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره به میزان ۲۰۰mg/Kg کم‌تر از گروه دریافت‌کننده عصاره به میزان ۱۰۰ mg/Kg بود. از نظر میزان گلوکز سرم، در هفته قبل از بررسی هیچ‌گونه تفاوت معنادار بین گروه‌ها یافت نشد. به‌علاوه، در موش‌های دیابتی درمان نشده، افزایش معنادار سطح گلوکز در هفته‌های چهارم و هشتم ($p<0.001$) پس از بررسی در مقایسه با هفته قبل از بررسی مشاهده گردید. از طرف دیگر، تیمار با عصاره

www.SID.ir

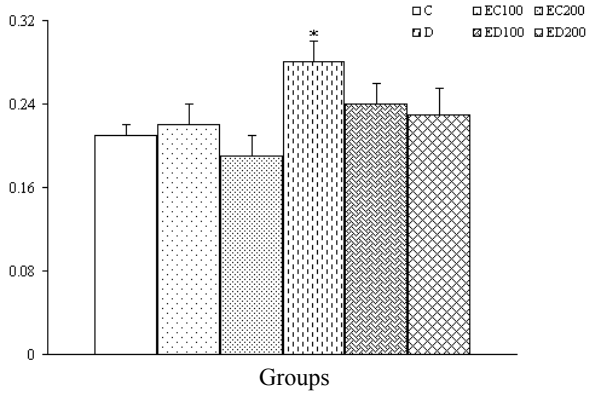
Archive of SID

آبی برگ شنبلیله هیچ‌گونه تغییر معنادار در سطح گلوکز گروه‌های کنترل در هفته‌های چهارم و هشتم پس از بررسی در مقایسه با هفته قبل از بررسی ایجاد نکرد و درمان موش‌های دیابتی با عصاره آبی برگ شنبلیله به میزان ۲۰۰ mg/Kg موجب کاهش معنادار سطح گلوکز در هفته‌های چهارم ($p<0.05$) و هشتم ($p<0.01$) پس از بررسی در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده در همین دوره‌های زمانی گردید و دوز ۱۰۰ mg/Kg از عصاره، تغییر معناداری را از این نظر به وجود نیاورد.

از نظر پاسخگویی حلقه‌های ایزوله آئورت سینه‌ای، مشخص شد که تجویز عصاره در هر دو دوز به موش‌های دیابتی به مدت ۲ ماه تغییر معناداری را در تون پایه عروقی در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده ایجاد نمی‌کند. به‌علاوه، تون پایه در گروه کنترل نیز تحت تأثیر این تیمار قرار نگرفت. با وجود این، تون پایه عروقی در موش‌های دیابتی تیمار نشده به‌طور معنادار بیش‌تر از گروه کنترل بود ($p<0.05$) (شکل ۱). از طرف دیگر، حداکثر پاسخ انقباضی به نورآدرنالین که در غلظت 10^{-4} مولار حاصل گردید (شکل ۲) در مورد گروه دیابتی درمان نشده به‌طور معنادار ($p<0.001$) بیش‌تر از گروه کنترل بود. همچنین مشخص گردید که یک اختلاف معنادار ($p<0.01$) در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره به میزان ۲۰۰ mg/Kg در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده یافت می‌شود.

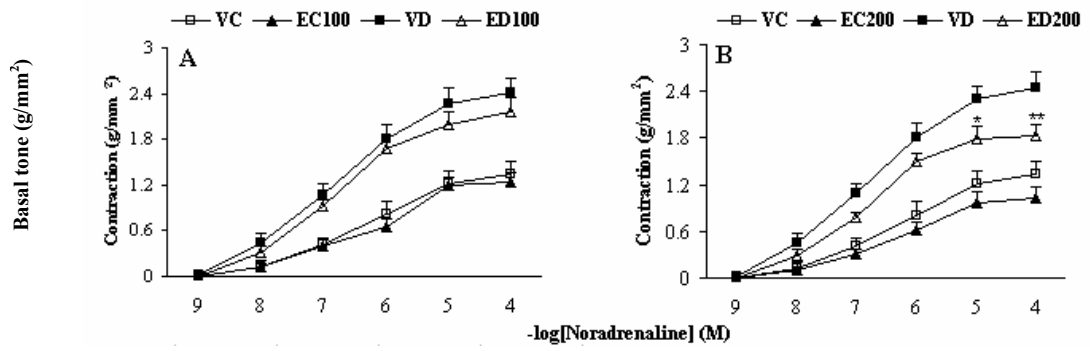
بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که دیابت قندی در موش‌های صحرایی به مدت ۲ ماه با افزایش میزان تون پایه و فعال حلقه‌های ایزوله آئورت سینه‌ای همراه بوده، تیمار موش‌های دیابتی با عصاره آبی برگ شنبلیله به مدت دو ماه فقط موجب کاهش معنادار میزان تون فعال عروقی القا شده بر اثر اضافه شده نورآدرنالین می‌گردد.



شکل ۱- پاسخگویی پایه حلقه‌های آئورت سینه‌ای در گروه‌های مختلف شامل کنترل(C)، کنترل تحت تیمار با عصاره آبی برگ شنبلیله در دو دوز ۲۰۰g/Kg و ۱۰۰ (EC200 و EC100)، دیابتی (D)، و دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ شنبلیله در دو دوز۲۰۰mg/Kg و ۱۰۰ (ED200 و ED100) پس از گذشت دو ماه.

* P<0.05 (در مقایسه با گروه کنترل)



شکل ۲- حداکثر پاسخگویی فعال القا شده بر اثر اضافه شدن غلظت‌های افزایش یابنده نورآدرنالین در حلقه‌های آئورت سینه‌ای در گروه‌های مختلف شامل کنترل(C)، کنترل تحت تیمار با عصاره آبی برگ شنبلیله در دو دوز۲۰۰ mg/Kg (B) و ۱۰۰ (A)(EC200 و EC100)، دیابتی (D)، و دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ شنبلیله در دو دوز۲۰۰mg/Kg (B) و ۱۰۰ (A) (ED200 و ED100) پس از گذشت ۲ماه.

* p<0.05, ** p<0.01 (در مقایسه با گروه دیابتی)

www.SID.ir

Archive of SID

دیابت قندی ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی از قبیل آتروسکلروز، هیپرتانسیون و در نتیجه میزان مرگ و میر را افزایش می‌دهد [۹]. به نظر می‌رسد مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد اختلال در ساختمان و عملکرد عروق خونی در دیابت دخالت داشته باشند که نهایتاً منجر به ایجاد این‌گونه عوارض می‌گردند. در دیابت قندی، ظرفیت آندوتلیوم عروق در سنتز گشادکننده‌های عروقی، مانند پروستاسایکلین و نیتریک اکسید کم شده، تنگ‌کننده‌های عروقی مانند آندوتلین به مقدار زیاد تولید می‌شوند [۸]. هر چند در مورد نقش هیپرگلیسمی مزمن در بروز عوارض ماکروواسکولار در حالت دیابت قندی شواهد قطعی وجود ندارد، ولی برخی از نتایج به‌دست آمده خود هیپرگلیسمی و تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از آن را دلیل بروز این عوارض می‌دانند [۹]. مطالعات اخیر نشان داده که در دیابت قندی، اختلال متابولیسم گلوکز و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی می‌شوند که افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش دفاع آنتی اکسیدانی، نقش مهمی در ایجاد آتروسکلروز و افزایش نفوذ پذیری و اسکلروز عروق خونی دارد [۸]. به‌علاوه در بیماران دیابتی، تولید رادیکال‌های آزاد از طریق اتواکسیداسیون گلوکز،فعال شدن مسیر سیکلو اکسیژناز، و تولید اکسیژن فعال به‌وسیله کربوهیدرات و چربی‌ها افزایش می‌یابد [۱۰]. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که پاسخ انقباضی حلقه‌های آئورتی دارای آندوتلیوم به نورآدرنالین در موش‌های صحرایی نرِ دیابتی به‌طور معنادار نسبت به حیوانات سالم افزایش یافته است. مطالعات گذشته نیز بیانگر افزایش پاسخ انقباضی آئورت موش‌های صحرایی دیابتی به نور آدرنالین در مقایسه با موش‌های صحرایی سالم است [۸].

در بررسی حاضر، همچنین مشخص گردید که تجویز عصاره آبی برگ شنبلیله به میزان ۲۰۰ mg/Kg به مدت دو ماه توسط موش‌های دیابتی فقط می‌تواند موجب کاهش در حداکثر پاسخ انقباضی به‌دنبال اضافه کردن نورآدرنالین در نمونه‌های واجد اندوتلیوم گردد. هر چند که ماهیت شیمیایی مواد فعال موجود در این عصاره آبی با خاصیت ضد دیابتی و محافظت‌کننده به خوبی شناخته نشده [۶]، ولی می‌توان آثار سودمند آن را به خاصیت پایین آورندگی گلوکز و لیپیدهای سرم نسبت داد [۷]. به‌علاوه، چون گیاه شنبلیله حاوی مقادیر زیاد از ساپونین‌ها و تانین‌ها است و این مواد، خود جذب روده‌ای چربی‌ها را از دستگاه گوارش کاهش داده، به مهار آنزیم‌های کلسترول استراز، سنتزکننده اسید چرب، و استیل کوانزیم A کربوکسیلاز منجر می‌شوند و با توجه به این موضوع که بررسی حاضر در طی یک مدت زمان طولانی به انجام رسیده است، لذا این احتمال وجود دارد که بخشی از اثربخشی این عصاره در تحقیق حاضر از این طریق به انجام رسیده باشد [۱۱و۱۲].

به‌طور خلاصه، نتیجه‌گیری می‌شود که تجویز دراز مدت عصاره آبی برگ شنبلیله در کاهش دادن پاسخ انقباضی سیستم عروقی موش‌های دیابتی و احتمالاً در جلوگیری از بروز هیپرتانسیون در موش‌های صحرایی دیابتی مؤثر است. هم‌چنین انجام تحقیقات وسیع‌تر برای مشخص کردن مکانیسم اثر این گیاه و مواد مؤثره آن در دو حالت نرمال و دیابتی پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه شاهد (تهران) در سال ۱۳۸۰ است. ضمناً نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از کارشناس محترم دانشکده پزشکی شاهد، سرکار خانم فریبا انصاری به واسطه پیگیری در تهیه وسایل و مواد مورد نیاز اعلام می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. American Diabetes Association: Clinical practice recommendation, screening for diabetes. Diabetes Care 1997;20: 22-24.
2. Mathieu C.: Can we reduce hypoglycaemia with insulin detemir? Int J Obes Relat Metab Disord. 2004;28 Suppl 2:S35-40.
3. Madar Z, Stark AH. New legume sources as therapeutic agents. Br J Nutr. 2002;88 Suppl 3:S287-92.
4. Ivorra MD, Paya M, Villar A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. J Ethnopharmacol 1989;27:243-275.
5. Puri D, Prabhu KM, Murthy PS. Mechanism of action of a hypoglycemic principle isolated from fenugreek seeds. Indian J Physiol Pharmacol 2002;46(4):457-462.
6. Abdel-Barry JA, Abdel-Hassan IA, Al-Hakiem MH. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of Trigonella foenum-graecum leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 1997;58(3):149-155.
7. Abdel-Barry JA, Abdel-Hassan IA, Jawad AM, al-Hakiem MH. Hypoglycaemic effect of aqueous extract of the leaves of Trigonella foenum-graecum in healthy volunteers. East Mediterr Health J 2000;6(1):83-98.
8. Mori S, Takemoto M, Yokote K, Asaumi S, Saito Y. Hyperglycemia-induced alteration of vascular smooth muscle phenotype. J Diabetes Complications 2002;16(1):65-68
9. Choi JS, Yokozawa T, Oura H. Improvement of hyperglycemia and hyperlipemia in streptozotocin-diabetic rats by a methanolic extract of Prunus da6idiana stems and its main component, prunin, Planta Med 1991; 57:208–211.
10. Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G, Furukawa Y, Furukawa S. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. Neurotoxicology and Teratology 2002;24:695–701.
11. Sauvaire Y, Ribes G, Baccou JC, Loubatieeres-Mariani MM. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. Lipids 1991;26(3):191-197.
12. Sauvaire Y, Baissac Y, Leconte O, Petit P, Ribes G. Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties. Adv Exp Med Biol 1996;405:37-46.

www.SID.ir