

اثر ضد دردی عصاره متانولی دانه گشنیز (*Coriandrum sativum*) در مدل تجربی دیابت قندی در موش صحرایی

مهرداد روغنی^۱، توراندخت بلوچ نژاد مجرد^۲، علی باقری^۳ و سیدمسعود اطمیابی^۳

چکیده

در این پژوهش اثر ضد دردی عصاره متانولی دانه گشنیز در موشهای صحرایی نر مبتلا به دیابت قندی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین با استفاده از آزمون فرمالین مورد بررسی قرار گرفته است. برای این منظور از موش صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۵۰ گرم استفاده شد. موشها به طور کاملاً تصادفی به سه گروه کنترل، گروه دیابتی و گروه دیابتی درمان شده با دانه گشنیز تقسیم شدند. برای دیابتی کردن حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت تک دوز به میزان ۶۰ mg/Kg استفاده گردید. پس از گذشت یک ماه، آزمون فرمالین بر روی تمام موشها انجام گرفت. نتایج آزمون فرمالین نشان داد که میزان درد در موشهای دیابتی پس از گذشت یک ماه در فاصله دوم از مرحله حاد آزمون فرمالین (فاصله زمانی ۵-۱۰) افزایش معنی داری ($P < 0.001$) را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد (افزایش ۷۶٪) در حالی که تفاوت موجود بین دو گروه کنترل و دریافت کننده عصاره متانولی دانه گشنیز در همین فاصله زمانی کمتر معنی دار ($P < 0.05$) می باشد. با این وجود میزان درد در موشهای دیابتی دریافت کننده عصاره در دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین هیچ گونه تفاوت معنی داری را نسبت به هم نشان نداد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز عصاره الکلی دانه گشنیز به میزان ۱۰۰ mg/Kg به مدت یک ماه به موشهای دیابتی کاهش معنی داری را در میزان گلوکز خون و میزان احساس درد در مراحل حاد و مزمن آزمون فرمالین بوجود نمی آورد.

۱- استادیار گروه فیزیولوژی- تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی.

E-mail: mehjour@yahoo.com

۲- دانشیار گروه فیزیولوژی- تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی.

۳- دانشجوی پزشکی- تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی.

واژه‌های کلیدی: دانه گشنیز، دیابت قندی، هیپرالژزی، آزمون فرمالین، موش صحرایی

مقدمه

دیابت قندی (Diabetes Melitus) یکی از شایعترین بیماریهای اندوکرین است که یکی از عوارض شایع آن نوروپاتی اعصاب محیطی (Peripheral Neuropathy) می‌باشد که در این ارتباط درد از علائم مهم نوروپاتی دیابتیک بوده که یکی از شکایات مهم بالینی افراد مبتلا محسوب می‌شود و نحوه زندگی این افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین تعدیل درد در این افراد از اهمیت زیادی برخوردار است (Galer و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج برخی تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که قند خون بالا (Hyperglycemia) با اعمال اثرات توکسیک روی سیستم عصبی محیطی یکی از علل بروز نوروپاتی دردناک می‌باشد. علاوه بر این اثرات سیستمیک هیپر گلیسمی نیز می‌تواند موجب بروز نوروپاتی شوند (Dobretsov و همکاران، ۲۰۰۱). بر خلاف نتایج برخی تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که هیپر گلیسمی تأثیری در تغییر آستانه درد ندارد (Raz و همکاران، ۱۹۸۸). با توجه به اینکه گیاه گشنیز در درمان سنتی دیابت مورد استفاده قرار گرفته است و نتایج بررسیهای اخیر نشان می‌دهد که عصاره گیاه گشنیز خاصیت پایین آورندگی قند خون (H ypoglycemic) داراست (Chithra و Leelamma، ۲۰۰۰؛ Gray و Flatt، ۱۹۹۹؛ Swanson-Flatt و همکاران، ۱۹۹۰). بنابراین به نظر می‌رسد که عصاره این گیاه می‌تواند در درمان نوروپاتی دیابتیک دردناک مؤثر واقع شود. عصاره گشنیز با افزایش فعالیت آنزیم گلیکوژن سنتاز و افزایش غلظت گلیکوژن کبدی و تحریک مسیر گلیکولیز و پنتوز فسفات از طریق افزایش آنزیم‌های گلیکولیتیک و گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز و مهار آنزیم‌های گلوکونئوزنیک و گلیکوژن فسفریلاز و در نتیجه مهار روندهای گلیکونئوزن و گلیکوژنولیز روی متابولیسم کربوهیدراتها مؤثر بوده و سطح گلوکز خون را کاهش می‌دهد (Chithra و Leelamma، ۲۰۰۰). همچنین فعالیت شبه انسولینی و خاصیت آزاد کنندگی انسولینی گیاه گشنیز در تحقیقات اخیر به

اثبات رسیده است (Gray و Flatt, ۱۹۹۹). بنابراین در این پژوهش اثر ضد دردی عصاره متانولی دانه گشنیز در موشهای صحرایی نر مبتلا به دیابت قندی القاء شده توسط استرپتوزوتوسین با استفاده از آزمون فرمالین مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

حيوانات

در این تحقیق از موش صحرایی نر نژاد Wistar در محدوده وزنی ۳۵۰-۲۵۰ گرم به تعداد ۴۲ موش استفاده شد. حیوانات در شرایط نوری طبیعی در دمای ۱۹ تا ۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری شده و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمامی موشها حداقل یک هفته قبل از شروع آزمایشها به حیوانخانه دانشکده پزشکی و یک ساعت قبل از انجام آزمون فرمالین به آزمایشگاه منتقل گردیدند تا با شرایط آزمایشگاهی سازش حاصل نمایند.

روش تهیه عصاره الکلی دانه گشنیز

پس از تهیه دانه گشنیز جمع‌آوری شده در فصل تابستان و تأیید علمی و سیستماتیک آن، ۱۰۰ گرم از پودر آن در ۱۵۰ میلی لیتر از متانول حل شده، به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شده و پس از ۲-۳ بار فیلتر کردن، مایع بدست آمده در بن ماری در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار گرفته تا الکل به طور کامل تبخیر شده و عصاره غلیظ بدست آید. عصاره تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. محلول عصاره با غلظتهای پایین تر از طریق حل کردن آن در محلول سالین فیزیولوژیک سرد بدست آمد.

روش انجام کار

در این بررسی از آن دسته موشهای صحرایی نر استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری میزان گلوکز سرم آنها پایین‌تر از حد ۲۰۰ mg/dl بود. موشهای صحرایی سفید از نژاد ویستار (n=42) به طور کاملاً تصادفی به سه گروه کنترل شامل موشهای سالمی که عصاره در یافت نکرده بودند، گروه دیابتی شامل موشهای دیابتی که عصاره دریافت نکرده بودند و گروه دیابتی درمان شده با عصاره دانه گشنیز شامل موشهای دیابتی که با تزریق ۱۰۰mg/Kg عصاره متانولی دانه گشنیز به صورت یک روز در میان به مدت یک ماه تحت درمان قرار گرفتند تقسیم‌بندی شدند. برای دیابتی کردن حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت تک دوز به میزان ۶۰ mg/Kg حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده گردید. حجم تزریق محلول به حیوانات در هر گروه ۰/۵ میلی‌لیتر بود. پس از گذشت یک ماه، آزمون فرمالین بر روی تمام موشها انجام گرفت. در این ارتباط در مورد هر موش، آزمون فرمالین فقط یک بار انجام پذیرفت. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (زیست شیمی) و با استفاده از اسپکتروفتومتر به انجام رسید.

آزمون فرمالین

برای این آزمون از روش متداول Dubuisson and Dennis استفاده گردید (Dubuisson و Dennis، ۱۹۷۷). بدین ترتیب که حیوان در یک محفظه از جنس پلکسی گلاس (۳۰×۳۰×۳۰ سانتیمتر) در تحت شرایط آرام قرار گرفته و در قسمت زیر محفظه آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه قرار داشت تا وضعیت کف پای حیوان کاملاً

مشخص باشد. پس از گذشت یک ساعت ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۲/۵ درصد به صورت زیر جلدی به کف پای حیوان تزریق شد و شدت درد حیوان براساس تقسیم‌بندی زیر به چهار درجه تفکیک گردید: ۰- حیوان بدون توجه به پای تزریق شده می‌نشیند و یا راه می‌رود. ۱- پای حیوان با محفظه تماس داشته ولی حیوان وزن بدن خود را بیشتر روی پای سالم خود می‌اندازد. ۲- حیوان پنجه دردناک را کاملاً از سطح محفظه بلند می‌نماید. ۳- حیوان پنجه تزریق شده را از شدت درد می‌لیسد، گاز می‌گیرد یا به شدت تکان می‌دهد. ثبت پاسخهای رفتاری بلافاصله پس از تزریق فرمالین آغاز و تا دقیقه ۶۰ ادامه می‌یافت. در این ارتباط پاسخ در هر ۱۵ ثانیه ثبت و به عنوان شاخصی از میزان درد در آزمون فرمالین در نظر گرفته می‌شد. با استفاده از این روش اعداد ۰ تا ۳ برای امتیاز درد در زمانهای مختلف بدست می‌آید. میانگین درد در ده دقیقه اول بعد از تزریق فرمالین به عنوان مرحله ابتدایی یا حاد (First phase) و در دقایق ۱۶ تا ۶۰ به عنوان مرحله مزمن یا تاخیری (Latent Phase) در نظر گرفته شد.

تحلیل آماری

تمام داده‌ها در بررسی حاضر به صورت $Mean \pm S.E.M$ بیان شده است. برای تحلیل آماری از آزمون one-way ANOVA و در صورت معنی‌دار شدن از تحلیل Tukey استفاده گردید. به علاوه $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای تحلیل آماری از برنامه Graphpad InStat و برای رسم نمودار از برنامه Microsoft Excel 1997 استفاده گردید.

نتایج

در مطالعه حاضر اثر ضد دردی عصاره متانولی دانه گشنیز به میزان ۱۰۰ mg/Kg (هر هفته سه نوبت) به صورت داخل صفاقی پس از گذشت یک ماه در موشهای دیابتی

شده توسط استرپتوزوتوسین (60mg/Kg) با استفاده از آزمون فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. با اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم مشخص شد که میزان قند خون در دو گروه دیابتی و دیابتی تحت درمان با عصاره به ترتیب $478/5$ و $436/7$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر می‌باشد و گروه دیابتی تحت درمان تفاوت معنی‌داری را نسبت به گروه دیابتی از این نظر نشان نداد هر چند که مقادیر گلوکز سرم به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه کنترل ($131/8$ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) بود ($p < 0.001$). نتایج حاصله از آزمون فرمالین نشان داد که میزان درد در موشهای دیابتی پس از گذشت یک ماه در فاصله دوم از مرحله حاد آزمون فرمالین (فاصله زمانی ۱۰-۵) افزایش معنی‌داری ($P < 0.001$) را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد (افزایش 76%) در حالی که تفاوت موجود بین دو گروه کنترل و دریافت‌کننده عصاره متانولی دانه گشنیز در همین فاصله زمانی کمتر معنی‌دار ($P < 0.05$) می‌باشد (شکل شماره ۱). با این وجود میزان درد در موشهای دیابتی دریافت‌کننده عصاره در دو مرحله حاد و مزمن آزمون فرمالین هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را نسبت به هم نشان نداد. جدول شماره ۱ میزان درد را در دو مرحله حاد و مزمن در طی یک ساعت در گروههای مختلف در آزمون فرمالین نشان می‌دهد.

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز عصاره الکلی دانه گشنیز به میزان 100mg/Kg (هفته‌ای سه نوبت) به‌صورت داخل صفاقی پس از گذشت یک ماه به موشهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (60mg/Kg) تغییر معنی‌دار در میزان گلوکز خون و میزان احساس درد در آزمون فرمالین (دو مرحله حاد و مزمن) در مقایسه با گروه دیابتی (که عصاره دریافت نمی‌کند) به‌وجود نمی‌آورد. نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که موشهای صحرائی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین به‌طور غیر منتظره یک رفتار

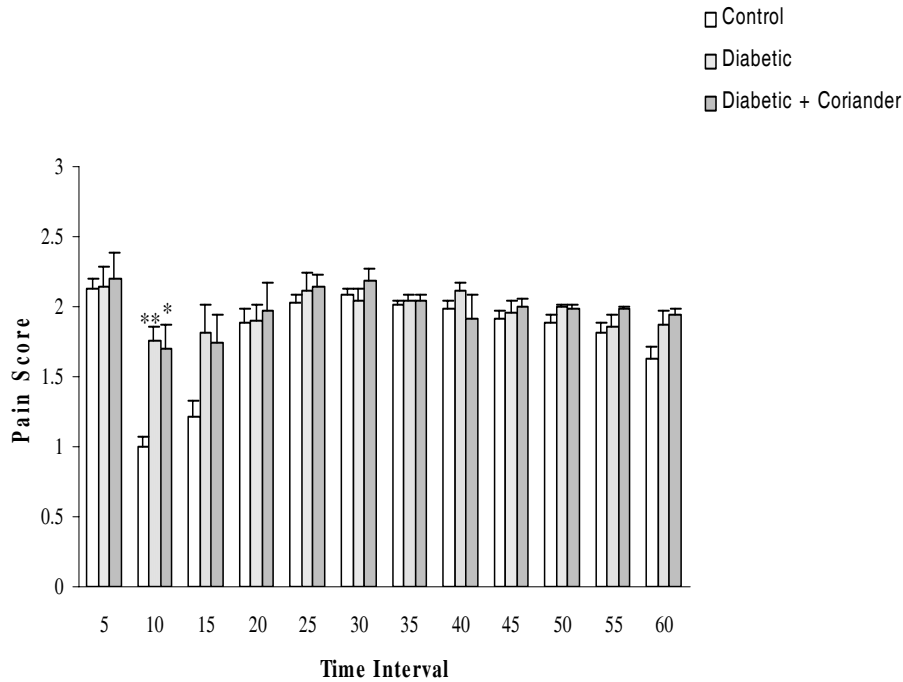
تشدید شده مربوط به درد را در آزمون فرمالین به دنبال تجویز محرکهای شیمیایی به داخل پنجه پا پس از گذشت ۳-۴ هفته نشان می‌دهند که خود دلالت بر وجود مکانیسمهای غیر طبیعی و متعدد در پردازش سیگنالهای محیطی درد دارد (Cesena و Caleutt, ۱۹۹۹). قبلاً وجود هیپرالژزی مکانیکی به‌عنوان اولین نشانگان نوروپاتی دیابتیک به اثبات رسیده است که علت آن تا حدودی به اثرات توکسیک مقادیر بالای گلوکز بر سیستم عصبی محیطی و فعال شدن مسیرهای بیوشیمیایی آلدوز ردوکتاز و polyol نسبت داده شده است (Dobretsov و همکاران، ۲۰۰۱؛ Chithra و Leelamma, ۱۹۹۹؛ Dobretsov و همکاران، ۲۰۰۳). به‌علاوه وجود حالت دیابت پردازش سیگنالهای درد را در ناحیه نخاع تحت تأثیر قرار می‌دهد (Calcutt, ۲۰۰۲). با این وجود شواهدی یافت می‌شود که بر آن اساس خود هیپرگلیسمی به تنهایی نمی‌تواند در برخی مدل‌های تجربی دیابت هیپرالژزی ایجاد نماید (Piercy و همکاران، ۱۹۹۹). شواهد تحقیقاتی متعدد مبنی بر اثر بخشی عصاره گیاه گشنیز در گیاه درمانی دیابت قندی یافت می‌شود که در این ارتباط وجود مواد پایین آورنده قند خون در آن به اثبات رسیده است و خود عصاره فعالیت آزادکنندگی انسولین و فعالیت شبه‌انسولینی نشان می‌دهد (Gray و Flatt, ۱۹۹۹). به‌علاوه نتایج تحقیقات متعدد مشخص کرده است که عصاره گیاهانی نظیر گشنیز (*Coriandrum sativum*) قادر به کاهش قند خون (Hypoglycemic effect) می‌باشند که این عمل را به‌طور عمده از طریق افزایش تجزیه مواد قندی، افزایش تحمل گلوکز، افزایش فعالیت آنزیمهای هگزوکیناز و فسفوجلوکوموتاز در راه گلیکولیز، افزایش ترکیب گلیکوژن و کاهش تجزیه آن (کاهش فعالیت آنزیم گلیکوژن فسفریلاز) در کبد، افزایش مصرف گلوکز در راه پنتوز فسفات (افزایش فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز، کاهش گلوکونئورنز (کاهش فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفاتاز در کبد) انجام می‌دهند (Chithra و Leelamma, ۲۰۰۰). نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که موشهای صحرایی دیابتی شده توسط

استرپتوزوتوسین را می‌توان به‌عنوان مدل درد مزمن به حساب آورد که در مورد آن نشانه‌های هیپرآلژی (Hyperalgesia) و آلودینی (Allodynia) در کوتاه مدت (۱ الی دو ماه) به خوبی مشاهده می‌شود (Courteix و همکاران، ۱۹۹۴). در بررسی حاضر با توجه به این موضوع که هیچ‌گونه کاهش معنی‌دار در میزان گلوکز سرم در موشهای دیابتی درمان شده با عصاره الکلی دانه گشنیز در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده نگردید بنابراین منطقی به نظر می‌آید که میزان درد در گروه تحت درمان نیز کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه دیابتی نشان ندهد که این به خوبی در نتایج بدست آمده مشهود است.

به‌طور خلاصه، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز عصاره الکلی دانه گشنیز به میزان ۱۰۰ mg/Kg به مدت یک ماه به موشهای دیابتی کاهش معنی‌داری را در میزان گلوکز خون و میزان احساس درد در مراحل حاد و مزمن آزمون فرمالین بوجود نمی‌آورد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر وافر خود را از سرکار خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد در تهیه عصاره و کمک به انجام آزمایشها اعلام می‌دارند.



شکل شماره ۱- شکل اثر تزریق داخل صفاقی عصاره متانولی دانه گشنیز
 (Coriandrum sativum; 100 mg/Kg) بر میزان درد در آزمون فرمالین در
 موشهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (60 mg/Kg) پس از گذشت یک ماه را
 نشان می‌دهد. $P < 0.05$, $P < 0.001$ ** (در مقایسه با گروه کنترل)

جدول شماره ۱- اثر تزریق عصاره متانولی دانه گشنیز بر مراحل درد در موشهای دیابتی
 با استفاده از آزمون فرمالین

عصاره + دیابتی	دیابتی	کنترل	گروه
			مرحله
$1/95 \pm 0/18$	$1/95 \pm 0/12$	$1/56 \pm 0/07$	حاد
$2/02 \pm 0/07$	$1/99 \pm 0/08$	$1/91 \pm 0/06$	مزمن

منابع مورد استفاده

- Calcutt, N.A., 2002. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes, *Int Rev Neurobiol*; 50: 205-228.
- Cesena, R.M., Caleutt, N.A., 1999, Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats., *Neurosci Lett*; 262: 101-104.
- Chithra, V., Leelamma, S., 1999, Coriandrum sativum-mechanism of hypoglycemic action., *Food Chemistry*; 67: 229-231.
- Chithra, V., Leelamma, S., 2000, Coriandrum sativum--effect on lipid metabolism in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. *J Ethnopharmacol*; 71: 457-463.
- Courteix, C., Bardin, M., Chantelauze, C., Lavarenne, J., Eschaliere, A., 1994, Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics., *Pain*; 57: 153-60.
- Dobretsov, M., Hastings, S.L., Romanovsky, D., Stimers, J.R., Zhang, J.M., 2003, Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia., *Brain Res*; 960: 174-183.
- Dobretsov, M., Hastings, S.L., Stimers, J.R., Zhang, J.M., 2001, Mechanical hyperalgesia in rats with chronic perfusion of lumbar dorsal root ganglion with hyperglycemic solution., *J Neurosci Methods*; 110: 9-15.
- Dubuisson, D., Dennis, S.G., 1977, The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats., *Pain*; 4: 161-174.
- Galer, B.S., Gianas, A., Jensen, M.P., 2000, Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life., *Diabetes Res. Clin. Pract.*; 47:123-128.
- Gray, A.M., Flatt, P.R., 1999, Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander)., *Br. J. Nutr*; 81: 203-209.
- Piercy, V., Banner, S.E., Bhattacharyya, A., Parsons, A.A., Sanger, G.J., Smith, S.A., Bingham, S., 1999, Thermal, but not mechanical, nociceptive behavior is altered in the Zucker Diabetic Fatty rat and is independent of glycemic status., *J. Diabetes Complications*; 13: 163-9.
- Raz, I., Hasdai, D., Seltzer, Z., Melmed, R.N., 1988, Effect of hyperglycemia on pain perception and on efficacy of morphine analgesia in rats., *Diabetes*; 37: 1253-1259.
- Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J., Flatt, P.R., 1990, Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice., *Diabetologia*; 33: 462-464.