Research Paper

Effect of Extracts of Cloves (*Syzygium Aromaticum*) on Hepatic Cell Damage and Oxidative Stress Caused by Diabetes in Adult Rats

Tala Pourlak[1], Monireh Halimi[1], Tannaz Pourlak[2], Parham Maroufi[3*], Saber Ghaderpour[4], Arefeh Shokoohi[5]

1. Department of Pathology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
2. Aging Research Institute, Tabriz University of Medical Sciences Tabriz, Iran.
3. Department of Orthopedics, Shohada Medical Research, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences,Tabriz, Iran.
4. Department of Physiology, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
5. Student Research Committee, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnord, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Pourlak T, Halimi M, Pourlak T, Maroufi P, Ghaderpour S, Shokoohi A. [Effect of Extracts of Cloves (*Syzygium aromaticum*) on Hepatic Cell Damage and Oxidative Stress Caused by Diabetes in Adult Rats (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2020; 26(4):432-447. https://doi.org/10.32598/hms.26.4.3400.1

https://doi.org/10.32598/hms.26.4.3400.1

CC BY NC

Received: 17 May 2020
Accepted: 17 Aug 2020
Available Online: 01 Oct 2020

Key words:
Cloves, Oxidative stress, Diabetes, Insulin

ABSTRACT

Aims In this study, we investigated the effect of clove extract (Syzygium aromaticum) on liver cell damage and oxidative stress caused by diabetes in adult rats.

Methods & Materials For this study, 28 female rats were collected and divided into four groups: A: Control group; B: Diabetic Control group (DC) which received 20% glycerol dissolved in normal saline as carriers; C: Diabetic rats (DSA) treated with cloves hydroalcoholic extract (4 mg/kg); d) diabetic rats (DG) treated with glibenclamide (5 mg/kg) as a standard drug.

Findings The fasting blood sugar and serum triglyceride levels in the DC group increased significantly compared to the control group (P<0.05). In DC, DG, and DSA groups, high-density lipoprotein, and serum insulin levels decreased significantly compared to the control group (P<0.05). Also, in DG and DSA groups, high-density lipoprotein and serum insulin levels increased significantly compared to the DC group.

Conclusion Cloves can affect fasting blood sugar, serum insulin levels, serum fat profile levels, and prevent liver tissue damage in diabetic rats caused by streptozotocin.

English Version

1. Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by high blood sugar, vascular problems, neurological problems [1], and high blood glucose levels due to decreased insulin excretion or insulin resistance or both [2, 3]. There are two types of diabetes: type 1 and type 2. In type 1 diabetes or insulin-dependent diabetes, pancreatic beta cells are destroyed and insulin secretion from these cells is impaired [4]. Typically, less than 10% of diabetic patients have type 1 diabetes [5]. The number of diabetics in 2003 reached 194 million between the ages of 20 and 79 years. An increase of up to 50% is expected in 2010, most of which are new patients found in Africa and Asia [6]. The prevalence of type 2 diabetes is also a public health concern and accounts for about 10 million chronic diseases and a significant percentage of deaths worldwide each year. It is estimated that about 5% to 8% of adults in the world have diabetes. The International Diabetes Association reported 285 million people with type 2 diabetes worldwide in 2010 and predicts that it will

* *Corresponding Author:*
Parham Maroufi, PhD.
Address: Department of Orthopedics, Shohada Medical Research, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences,Tabriz, Iran.
Tel: +98 (41) 33893336
E-mail: drparhammarofi@gmail.com

www.SID.ir

reach 438 million by 2030 [7]. People with diabetes are at risk for advanced cardiovascular diseases because of high blood glucose levels [4]. Evidence suggests that oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of both types of diabetes. An unusual increase of free radicals and a simultaneous decrease of antioxidant defense mechanisms can damage cellular organelles, increase lipid peroxidation, and develop insulin resistance [8, 9]. Chronic hyperglycemia can cause extensive and irreversible damage to the eyes, nerves, kidneys, heart, and blood vessels, and other parts of the body. Liver is one of the organs that is damaged in diabetes [10]. It is an effective organ in maintaining normal blood glucose levels, and hyperglycemia leads to an imbalance in oxidation-reduction (redox) reactions within hepatocytes Thus, hyperglycemia causes the production of free radicals by increasing the production of advanced glycation end products by disrupting the production of superoxide scavengers such as reactive oxygen species (ROS), endogenous Superoxide Dismutase (SOD), and Catalase (CAT). Thus, it is clear that diabetic liver damage is caused by several factors and cannot be controlled only by inhibiting hyperglycemia [11].

In diabetic animals, the activities of SOD, CAT, and glutathione are reduced [9]. CAT and SOD are the most important known oxidative enzymes. SOD, which is present in most aerobic organisms and converts superoxide to hydrogen peroxide and oxygen in the cytoplasmic space, may protect DNA and intracellular organelles from damages caused by ROS [12]. Recent evidence suggests using traditional herbal remedies for diabetes. Herbs often contain significant amounts of antioxidants, including tocopherols (vitamin E), carotenoids, ascorbic acid (vitamin C), flavonoids, and tannins. It has been suggested that the antioxidant action of these plants may be an essential and important property of herbal medicines used to treat diabetes [4].

Cloves (Syzygium aromaticum) is a fragrant sprout plant commonly used in Africa, Asia, and other parts of the world. Syzygium aromaticum (DSA) has several therapeutic effects, including antibacterial, antifungal, and kidney strengthening effects, and has traditionally been used as a preservative and antimicrobial in food [8, 13]. In a study, the effect of DSA on lowering glucose levels and increasing serum insulin, the levels of SOD and CAT enzymes were investigated [8]. Also, the antioxidant effects of DSA and its ability to reduce malondialdehyde (MDA) have been studied [14]. This study aimed to evaluate the effect of DSA on liver cell damage and oxidative stress caused by diabetes in adult rats.

2. Materials and Methods

For this study, 28 female mice weighing an average of 200-250 g were used. The animals were purchased from the Razi Institute of Mashhad, Mashhad city, Iran, and kept in standard conditions (temperature 25°C, and 12:12 hours of light:dark cycle). During the experiment, rats had free access to water and food. All research stages of this study were performed following the instructions related to the care and use of laboratory animals of Gonabad University of Medical Sciences.

Rats were randomly divided into one healthy control group (n =7) and three experimental groups (n = 21). To induce diabetes in the experimental groups, a single intraperitoneal injection of 50 mg/kg streptozotocin (STZ) (Sigma) dissolved in 5 mm of 0.1 M citrate buffer (pH = 4.5) was performed [6]. In the control group (normal), the same amount of citrate buffer was injected as a single dose instead of STZ. About 72 hours after the injection, rat blood glucose was measured to confirm diabetes (blood glucose > 250 mg/dL was considered diabetic).

Diabetic rats were divided as follows: a) the healthy control group, b) the diabetic control group (DC) that received normal saline as a solvent, c) diabetic rats treated with 50 mg/kg of hydroalcoholic extract of DSA, d) diabetic rats (DG) treated with 5 mg/kg glibenclamide (GBC) as a standard drug. Treatment was performed once a day for 21 days for all groups by intraperitoneal injection. After a treatment period of 21 days, the rats were anesthetized and their blood samples were taken and their kidneys, pancreas, and liver were frozen at -70°C. Blood samples were used to test for glucose, insulin, lipid profiles, some oxidative stress markers, and antioxidant enzymes. Their serum samples were stored at -70°C.

To extract the hydroalcoholic extract of DSA, we first pulverized the dried clove buds that were prepared and mixed in absolute alcohol and distilled water at a rate of 50% and shaken by a shaker for 48 hours. It was then filtered and centrifuged at 1000 rpm. After evaporating water and alcohol, we dissolved the powder obtained as an extract in normal saline and used it at a dose of 4 mg/kg.

SOD activity was measured using the RANSOD (UK) kit method. MDA was measured by placing plasma in a test tube containing glacial acetic acid, to which 1% thiobarbituric acid in 2% NaOH was added. An equal volume (600 µL/L) of glacial acetic acid and thiobarbituric acid solutions was added to 40 µL of plasma. The test tube containing the mixture was then placed in boiling water for 15 minutes. After cooling, the adsorption was read at 532 nm. MDA

www.SID.ir

level was calculated using the MDA-TBA absorption coefficient (ε=1.56 ×105 cm-1M-1) [13, 15].

Serum glutathione peroxidase (GPx) level was measured using the Pars Test Kit (Iran) method. Finally, the data obtained from this experiment were analyzed by 1-way analysis of variance, and Tukey's post hoc test was used to determine the groups with significant differences (P<0.05). In this study, the data were presented as Mean±SEM form.

3. Results

Fasting Blood Sugar (FBS)

Fasting Blood Sugar (FBS) level in the DC group increased significantly compared to the healthy control group (P<0.05). Also, FBS levels in DG and DSA groups showed a significant decrease compared to the DC group (P<0.05) (Figure 1).

Serum insulin levels

In the DC, DG, and DSA groups, serum insulin levels significantly decreased compared to the healthy control group (P<0.05). Also, in the DG and DSA groups, insulin levels increased compared to the DC group. This increase was significant in the DSA group (P<0.05) (Figure 2).

Serum levels of fat profile

Serum cholesterol level

The serum cholesterol level in the DC group was significantly higher than that in the healthy control group (P<0.05).

Table 1. Results of serum lipid profile presented as Mean±SEM

Group	Mean±SEM			
	Low-density Lipoprotein	High-density Lipoprotein	Cholesterol	Triglyceride
Healthy control	19.4807±0726*	34.8412±0.57*	64.0150±2.23*	38.5965±1.58*
Diabetic control	25.2614±1.26	27.8700±1.13	8.1617±2.13	62.3748±3.58
Diabetic+DSA extract	13.8968±2.09*	43.6900±1.62*	59.0191±3.97*	44.6541±5.14*
Diabetic+GBC	8.6100±2.57*	30.9222±0.67*	72.9426±3.65*	40.6709±0.835*

Quarterly of The Horizon of Medical Sciences

Healthy control group: The healthy group treated with normal saline (for 20 days), diabetic control group: diabetic rats treated with normal saline (for 20 days), diabetic+DSA extract: diabetic group treatment with DSA extract at 4 mg/kg (for 20 days) Diabetic+GBC: Diabetic group treated with glibenclamide extract at 5 mg/kg (for 20 days). * Significantly different from the diabetic control group.

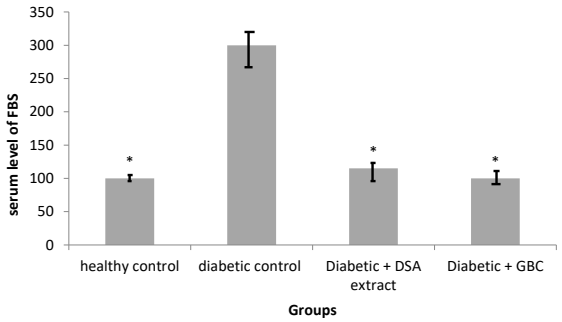
Table 2. Results of serum oxidative stress markers presented as Mean±SEM

Group	Mean±SEM		
	Superoxide dismutase	Glutathione peroxidase	Malondialdehyde
Healthy control	2.407±0.11	321.35±1.57*	0.11±1.478
Diabetic control	1.029±0.22	1.13±95.80	0.29±2.272
Diabetic+DSA extract	2.351±0.17*	2.56±226.10*	0.11±1.643*
Diabetic+GBC	2.179±0.21*	1.48±180.22*	0.20±1.859*

Quarterly of The Horizon of Medical Sciences

Healthy control group: The healthy group treated with normal saline (for 20 days), diabetic control group: the diabetic group treated with normal saline (for 20 days), diabetic+DSA extract: the diabetic group treated with 4mg/kg DSA extract (for 20 days) Diabetic+GBC: Diabetic group treated with GBC extract 5 mg/kg (for 20 days). * Significantly different from the diabetic control group.

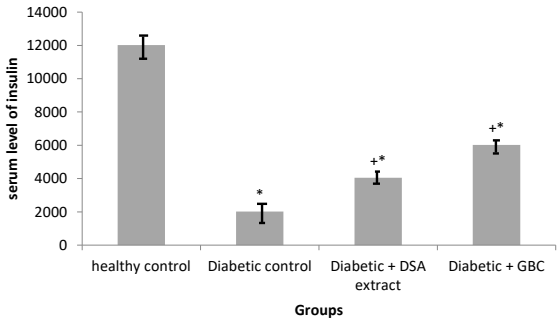
www.SID.ir



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 1. Chart of fasting serum glucose levels in study groups

Healthy control group: healthy group treated with normal saline (for 20 days), diabetic control group: diabetic group treated with normal saline (for 20 days), diabetic+DSA extract: diabetic group treated with 4mg/kg DSA extract (for 20 days) Diabetic+GBC: Diabetic group treated with GBC extract 5 mg/kg (for 20 days). * Significantly different from the diabetic control group.



Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Figure 2. Graph of serum insulin levels in study groups

Healthy control group: healthy group treated with normal saline (for 20 days), diabetic control group: diabetic group treated with normal saline (for 20 days), diabetic+DSA extract: diabetic group treated with 4mg/kg DSA extract (for 20 days) Diabetic+GBC: Diabetic group treated with GBC extract 5 mg/kg (for 20 days). * Significantly different from the diabetic control group.

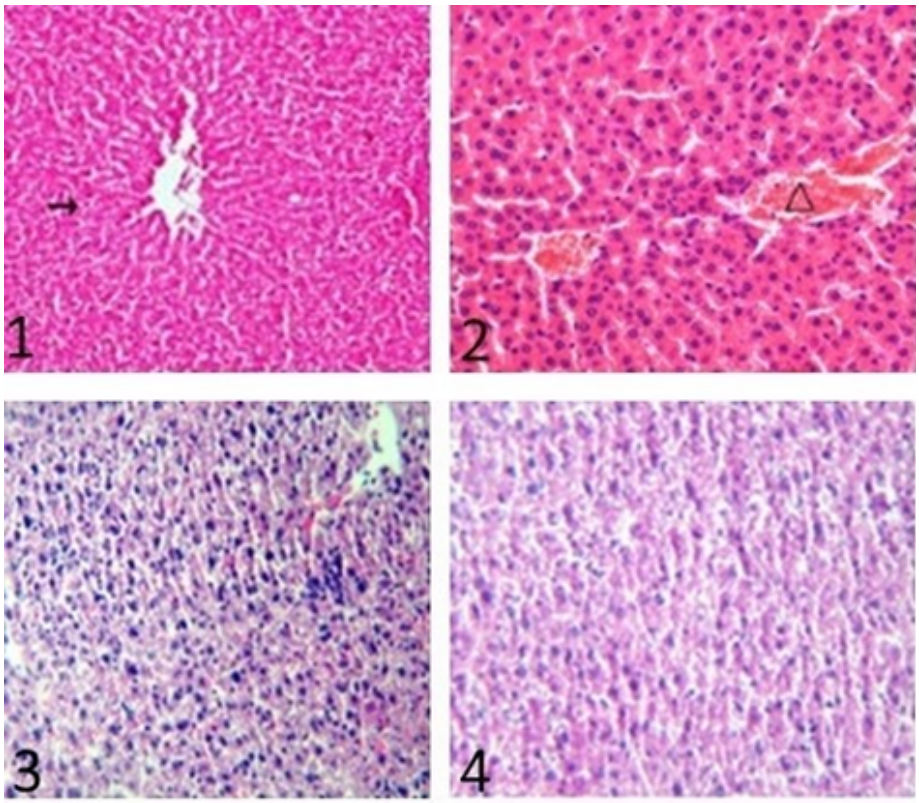


Figure 3. Examination of liver histological results (magnification, ×100)

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

1: Tissue section image related to the healthy control group; 2: Tissue section image related to the diabetic control group; 3: Tissue section image related to the diabetic group treated with DSA extract; 4: Tissue section image related to the diabetic group receiving GBC. The black arrow indicates the areas of tissue bleeding. The red arrow indicates the dilated sinusoid. The orange arrow indicates the central vein.

www.SID.ir

Also, cholesterol levels in DG and DSA groups decreased significantly compared to the DC group (P<0.05) (Table 1).

Levels of low-density lipoprotein (LDL)

The serum level of Low-Density Lipoprotein (LDL) increased slightly in the DC group compared to the healthy control group (P<0.05). Also, the LDL level in the DG and DSA groups decreased significantly compared to those in the DC group (P<0.05).

Serum levels of high-density lipoprotein (HDL)

The serum level of High-Density Lipoprotein (HDL) in the DC group significantly decreased compared to the healthy control group (P<0.05). Also, HDL significantly increased in DG and DSA groups compared to the DC group (P<0.05). On the other hand, HDL levels in the DSA group were significantly higher than the healthy control group (P<0.05) (Table 1).

Serum triglyceride (TG) levels

The serum triglyceride (TG) level in the DC group significantly increased compared to that in the healthy control group (P<0.05). Besides, TG mean level in the DSA group significantly decreased compared to that in the DC group (P<0.05) (Table 1).

Oxidative stress markers

Table 2 presents serum levels of glutathione peroxidase GPx, SOD, and MDA. The activity of GPx and SOD enzymes in the diabetic control group was significantly lower than those in the healthy group (P<0.05); however, treatment with clove extract increased the serum activity of GPx and SOD in comparison with the control diabetic group (P<0.05). In the diabetic control group, serum MDA level increased significantly compared to that in the healthy group (P<0.05). On the other hand, in the groups treated with clove extract, MDA significantly reduced compared to that in the control diabetes group (P<0.05) (Table 2).

Histopathology of the Liver

The liver tissue obtained from the healthy group was histologically normal. Histological studies have shown that diabetes leads to degenerative changes such as edema, rupture, bleeding in the central arteries, dilation of the sinusoids, and pyknotic nuclei. However, the degenerative changes mentioned in the treatment groups decreased (Figure 3).

4. Discussion

Streptozotocin (STZ) is a compound commonly used to induce type 1 diabetes in rats [16]. STZ causes diabetes by rapidly decreasing pancreatic beta cells, which ultimately leads to decreased insulin secretion. Glibenclamide (GBC) has been shown to cause hypoglycemia by increasing insulin secretion from beta cells in the pancreas. The compound is active in moderate STZ-induced diabetes (some beta cells are still healthy), while in severe diabetes it inactivates STZ (which is lost in almost all beta cells) [17]. Our results showed that GBC reduced FBS levels in hyperglycemic animals, so the diabetic status of the animals was moderate. The hypoglycemic effects of plant extracts depend on the extent to which pancreatic beta cells are destroyed. Treatment of moderate diabetic rats with medicinal plant extract resulted in the activation of beta cells and increased insulin production [18]. The antihyperglycemic activity of DSA was associated with an increase in plasma insulin, indicating that the antihyperglycemic activity of DSA may be due to the insulin-producing activity of this extract. The increase in insulin levels observed in the present study showed that the extract of DSA can lead to insulin secretion from the remnants of beta cells or regenerated beta cells. Also, the results of this study showed that the extract of DSA significantly reduced FBS due to increased insulin secretion [19].

Diabetes affects several metabolic pathways, including lipid metabolism. Insulin deficiency (type 1 diabetes) or low insulin function (type 2 diabetes) leads to decreased glucose uptake by tissues that need insulin (such as the liver) as well as increased glucose production by increasing gluconeogenesis, which ultimately leads to a decrease in blood sugar level. Because of the increase in glucose and a decrease in insulin levels in the blood plasma, the hepatic regulation of lipid metabolism is greatly altered. Insulin is an important regulator of many enzymes involved in lipolysis and lipogenesis, so its deficiency causes major changes in the activity of these enzymes and thus affects the overall metabolism of fats and fat profiles in various tissues [20].

In STZ-induced diabetes, elevated blood sugar levels are usually associated with elevated plasma cholesterol, triglycerides, and LDL but decreased HDL [21]. The activation of hormone-sensitive lipase during insulin deficiency is associated with the release of free fatty acids (FFAs) from adipose tissue [22]. Thus, excess fatty acids produced by STZ-induced diabetes in plasma enhance the conversion of excess fatty acids to phospholipids and cholesterol in the liver. These two substances along with excess triglycerides formed in the liver may be excreted into the blood as lipoproteins [16].

www.SID.ir

Our observations showed that DSA extract alone and in combination with GBC significantly reduced plasma cholesterol, triglycerides, and LDL compared to the diabetic control group. Also, DSA extract increased HDL compared to the diabetic control group (Table 1). DSA extract may restore plasma lipid status to normal by controlling lipid metabolism. These results were in agreement with the results of previous studies [23, 24].

Our observations showed that carnation caused a significant increase in GPx and SOD compared to the healthy control group (Table 2). Glutathione (GSH) is one of the cytoplasmic scavengers of radicals that can reduce free radicals [25]. It is generally believed that the protective effect of GSH against the oxidative degradation of lipids is achieved through GPx by reducing the endogenously formed hydroperoxides of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and converting them to hydroxyl derivatives [26]. GSH can inhibit the production of free radicals by temporarily forming metal catalysts, breaking chain reactions, reducing the concentration of Reactive Oxygen Species (ROS), and increasing the levels of enzymes involved in the antioxidant system (SOD, CAT, GPx, and GST) [27, 28].

Selenium is an important cofactor for the SOD enzyme [29] and the use of DSA extract in rats increases selenium, reduces oxidative stress, and liver damage. Similar results were observed in the study of Adefegha et al. [8], which showed that the Fenton reaction is a combination of H2O2 and Fe2+, which is frequently used to induce lipoxygenase (LPO) reactions [30]. LPO releases hydrogen, the most powerful oxidant in the biological system, from PUFA and hydroxyl radicals, and it can use hydrogen released from PUFA to increase oxidative stress [29].

The antioxidant activity of DSA may be due to phenolic compounds such as eugenol, eugenol acetate, and thymol [31]. DSA can prevent cell damage by scavenging free radicals, chelating temporary metal ions, inhibiting oxidant enzymes, or by repairing α-tocopherol from the α-tocofoxyl radical [32]. Also, flavonoids can scavenge O_2, OH, and peroxyl radicals and inhibit LPO activity [33]. DSA can increase SOD, GPx, and GSH and decrease MDA [34].

Hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic patients are associated with increased oxidative stress [35] and increased MDA levels in type 2 diabetic rats. This indicates that increased lipid peroxidation leads to tissue damage and the inability of antioxidant defense mechanisms to prevent the free radical attack, which may lead to leakage of enzymes and metabolites into the bloodstream [36]. Elevated levels of enzymes such as alanine transaminase (ALT), Aspartate Transaminase (AST), markers of liver damage, and evaluation of AST and ALT indicate liver status and necrotic cells, respectively [37]. Abnormal levels of alkaline phosphatase (ALP) in the blood can also indicate liver or bone problems [38]. In the present study, AST, ALT, and ALP levels were significantly higher in the diabetic group compared to the healthy control group. Also, in the group treated with DSA, a significant decrease in AST and ALT levels was observed compared to the diabetic group. In previous studies, an increase in ALT and AST enzymes was observed in diabetic patients [39, 40]. Nyblom et al. reported that in patients with progressive alcoholic liver disease, liver enzymes such as AST and ALT would increase [41]. DSA can reduce liver damage by increasing enzymes in the antioxidant system (SOD, CAT, and GPx) and reducing oxidative stress [42, 43]. Also, the results of liver histology in this study showed that DSA extract reduces liver tissue damage caused by diabetes.

5. Conclusion

The results of this study showed that DSA extract has beneficial effects in lowering blood sugar, oxidative stress, plasma cholesterol, triglycerides, and LDL level. DSA also increases blood insulin levels and improves liver tissue damage and has beneficial effects in reducing tissue damage caused by diabetes. Therefore, because of these beneficial effects of clove plant, it can be used as an effective herbal medicine in reducing and treating the complications of diabetes on liver tissue.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The ethical code of this research (IR.TBZMED.VCR.REC.2018.167) has been obtained from the Ethics Committee of Research Projects of Tabriz University of Medical Sciences.

Funding

This article is the result of a research project on diabetic rats approved by the Student Research Committee of Tabriz University of Medical Sciences. The project did not receive financial support.

Authors' contributions

Study concept: Tala Pourlak and Monireh Halimi; Writing and final approval of the article: Tala Pourlak, Monireh Halimi, Parham Maroufi, Saber Ghaderpour, Arefeh Shokouhi; Data collection and interpretation: Tala Pourlak, Saber Ghaderpour, and Arefeh Shokouhi

www.SID.ir

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the Vice-Chancellor for Research and Technology of Tabriz University of Medical Sciences and the Student Research Committee of Tabriz University of Medical Sciences and all those who helped in this research.

www.SID.ir

اثر عصاره میخک بر آسیب سلول‌های کبدی و استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت در موش‌های صحرایی بالغ

طلا پورلک[۱]، منیره حلیمی[۱]، طناز پورلک[۲]، *پرهام معروفی[۳]، صابر قادرپور[۴]، عارفه شکوهی[۵]

۱. گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۲. گروه جراحی دهان و فک، مرکز تحقیقات پیری، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۳. گروه ارتوپدی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۴. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
۵. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۸ اردیبهشت ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۲۷ مرداد ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۳۹۹

کلیدواژه‌ها:
میخک، استرس اکسیداتیو، دیابت، انسولین، کبد، موش صحرایی

چکیده

اهداف در این مطالعه اثر عصاره میخک صدپر بر آسیب سلول‌های کبدی و استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت در موش‌های صحرایی بالغ بررسی شد.

مواد و روش‌ها برای این مطالعه ۲۸ موش ماده به چهار گروه تقسیم شدند: الف) گروه کنترل؛ ب) گروه کنترل دیابتی (DC) که نرمال سالین به عنوان حلال دریافت کرد؛ ج) گروه موش‌های صحرایی دیابتی درمان‌شده با ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی میخک (DSA)؛ د) گروه موش‌های صحرایی که با ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیبنکلامید به عنوان یک داروی استاندارد (DG) درمان شدند.

یافته‌ها میزان قند خون ناشتا و سطح سرمی TG در گروه DC در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). در همه گروه‌های DG، DC و DSA در مقایسه با گروه کنترل، میزان HDL و انسولین سرم به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$) و همچنین در گروه‌های DG و DSA نسبت به گروه DC میزان HDL و انسولین سرم افزایش یافت.

نتیجه‌گیری میخک صدپر احتمالاً می‌تواند بر قند خون ناشتا، سطح سرمی انسولین، سطح سرمی پروفایل چربی مؤثر باشد و باعث پیشگیری از تخریب بافتی کبد در موش‌های صحرایی دیابتیک ناشی از STZ شود.

مقدمه

دیابت ملیتوس (DM)[۱]، یک بیماری متابولیک مزمن است که با افزایش قند خون، مشکلات عروقی، مشکلات عصبی [۱] و غلظت بالای گلوکز خون به دلیل کاهش دفع انسولین یا مقاومت در برابر انسولین یا هر دو مشخص می‌شود [۳،۲]. دو نوع دیابت وجود دارد: نوع ۱ و ۲. در دیابت نوع ۱ یا دیابت وابسته به انسولین، سلول‌های بتای لوزالمعده تخریب می‌شوند وترشح انسولین از این سلول‌ها دچار اختلال می‌شود [٤]. به طور معمول کمتر از ۱۰ درصد بیماران دیابتی، به دیابت نوع ۱ مبتلا هستند [۵]. تعداد بیماران دیابتی در سال ۲۰۰۳ به ۱۹٤ میلیون نفر در سنین بین ۲۰ تا ۷۹ سال رسیده بود. افزایش ۵۰درصدی در سال ۲۰۱۰ قابل پیش‌بینی بود که بیشتر این موارد جدید در آفریقا و آسیا بودند [٦]. شیوع دیابت نوع ۲ نیز یکی از نگرانی‌های سلامت عمومی است و در حدود ۱۰ میلیون از بیماری‌های مزمن و درصد معناداری از مرگ‌ومیرها را هرساله در جهان دربر می‌گیرد. بر اساس تخمین‌های ارائه‌شده در حدود ۵ الی ۸ درصد افراد بزرگسال دنیا به دیابت مبتلا هستند. انجمن بین‌المللی دیابت تعداد افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ را در سال۲۰۱۰، ۲۸۵ میلیون نفر در دنیا گزارش کرد و پیش‌بینی می‌کند که این تعداد تا سال ۲۰۳۰ به ۴۳۸ میلیون نفر برسد [۷]. افراد دیابتی به دلیل سطح بالای گلوکز خون در معرض بیماری‌های پیشرفته قلبی‌عروقی هستند [٤]. شواهد نشان می‌دهند که استرس اکسیداتیو نقش اصلی در پاتوژنز هر دو نوع دیابت دارد. افزایش غیرمعمول رادیکال‌های آزاد و کاهش هم‌زمان مکانیسم‌های محافظتی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند منجر به آسیب دیدگی ارگانل‌های سلولی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و پیشرفت مقاومت به انسولین شود [۹،۸].

۱. گروه دیابتیک دریافت کننده گلیبنکلامید

* نویسنده مسئول:
دکتر پرهام معروفی
نشانی: تبریز، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، گروه ارتوپدی.
تلفن: ۳۳۸۹۳۳۳۶ (۴۱) ۹۸+
پست الکترونیکی: drparhammarofi@gmail.com

www.SID.ir

هیپرگلیسمی مزمن می‌تواند ضایعات فراوان و جبران‌ناپذیری را در چشم‌ها، اعصاب، کلیه‌ها، قلب و عروق و سایر اعضای بدن به وجود آورد. کبد یکی از اندام‌هایی است که در بیماری دیابت دچار آسیب می‌شود [۱۰]. کبد، اندامی مؤثر در حفظ و برقراری سطح گلوکز خون در محدوده طبیعی بوده و افزایش قند خون منجر به عدم تعادل در واکنش‌های اکسیداسیون احیا در درون هپاتوسیت‌ها می‌شود؛ به این صورت که هیپرگلیسمی از طریق افزایش تولید AGEs[2] در تسهیل باعث تولید رادیکال‌های آزاد از طریق اختلال در تولید زداینده‌های سوپراکسید مثل ROS[3]، درون‌زاد دسموتاز (SOD)[4] و کاتالاز می‌شود؛ بدین ترتیب مشخص می‌شود که آسیب دیابتی کبد توسط فاکتورهای متعددی ایجاد شده و تنها با مهار هیپرگلیسمی قابل کنترل نیست [۱۱].

در حیوانات دیابتی، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)[5] و گلوتاتیون کاهش می‌یابد [۹]. کاتالاز و SOD مهم‌ترین آنزیم‌های اکسیداتیو شناخته‌شده هستند. SOD که در بیشتر ارگانیسم‌های هوازی موجود است، سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن در فضای سیتوپلاسمی تبدیل می‌کند و ممکن است از DNA و ارگانل‌های درون‌سلولی در برابر صدمات ناشی از واسطه‌های اکسیژن فعال محافظت کند [۱۲]. شواهد اخیر نشان می‌دهد که توجه به درمان‌های سنتی گیاهی برای دیابت بسیار مهم است. گیاهان غالباً حاوی مقادیر قابل توجهی آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله توکوفرول (ویتامین E)، کاروتنوئیدها، اسید اسکوربیک (ویتامین C)، فلاونوئیدها و تانن‌ها هستند و توصیه شده است که عمل آنتی‌اکسیدانی این گیاهان ممکن است یک خاصیت اساسی و مهم در درمان دیابت باشد [۴].

میخک صدپر[6] یک گیاه با جوانه ی معطر است که به طور کلی در آفریقا، آسیا و دیگر مناطق جهان استفاده می‌شود. میخک صدپرچندین تأثیر درمانی از خود نشان می‌دهد که از جمله آن‌ها می‌توان به اثرات آنتی‌باکتریال، ضدقارچ و تقویت سیستم کلیوی اشاره کرد و به طور سنتی این گیاه به عنوان یک ماده نگهدارنده و ضدمیکروبی در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۸، ۱۳]. در مطالعه‌ای تأثیر میخک صدپر روی کاهش سطح گلوکز و افزایش انسولین سرم و سطح آنزیم‌های CAT، SOD مورد بررسی قرار گرفته است [۸]. همچنین، اثرات آنتی‌اکسیدانی میخک صدپر و توانایی آن در کاهش میزان مالون دی‌آلدئید (MA)[7] مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۴]. هدف از انجام این مطالعه بررسی تأثیر میخک صدپر بر آسیب سلول‌های کبدی و استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت در موش‌های صحرایی بزرگسال است.

مواد و روش‌ها

برای این مطالعه از ۲۸ موش ماده با وزن متوسط ۲۰۰-۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات از مؤسسه رازی مشهد خریداری شده و در شرایط استاندارد نگهداری شدند (دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، و ۱۲/۱۲ ساعت چرخه روشنایی و تاریکی). در طی آزمایش، موش‌های صحرایی دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. کلیه مراحل تحقیقاتی این مطالعه مطابق با دستورالعمل‌های مربوط به نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم‌پزشکی گناباد انجام شده است.

موش‌های صحرایی به طور تصادفی به یک گروه کنترل سالم (n=۷) و سه گروه آزمایش (n=۲۱) تقسیم شدند. برای القای دیابت در گروه‌های آزمایش، تزریق داخل‌صفاقی تک‌دُز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین (STZ)[8] (سیگما) حل شده در ۵ میلی‌متر بافر سیترات ۱/۰ مولار (pH=۴/۵) انجام شد [۶]. در گروه کنترل (نرمال)، به همان اندازه بافر سیترات به جای STZ به صورت تک‌دُز تزریق شد. ۷۲ ساعت پس از تزریق، برای تأیید دیابتی شدن میزان قند خون موش‌های صحرایی اندازه‌گیری شد و قند خون بیش از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، نشانه دیابتی شدن در نظر گرفته شد.

موش‌های صحرایی دیابتی به ترتیب زیر تقسیم شدند: الف) گروه کنترل سالم؛ ب) گروه کنترل دیابتی (DC)[9] که نرمال سالین به عنوان حلال دریافت کرد؛ ج) موش‌های صحرایی دیابتی درمان‌شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی عصاره میخک صدپر؛ د) موش‌های صحرایی که با ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلیبنکلامید به عنوان یک داروی استاندارد[10] (DG) درمان شدند. درمان یک‌بار در روز به مدت ۲۱ روز برای همه گروه‌ها، به صورت تزریق داخل‌صفاقی انجام شد. پس از مدت‌زمان درمان (۲۱ روز)، موش‌های صحرایی بیهوش شدند و نمونه خون آن‌ها گرفته شد و کلیه‌ها، پانکراس و کبد در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای آزمایش گلوکز، انسولین، پروفایل چربی، برخی از نشانگرهای استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از نمونه خون استفاده شد. نمونه‌های سرم آن‌ها در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نحوه عصاره‌گیری میخک: برای استخراج عصاره هیدروالکلی میخک، ابتدا جوانه خشک‌شده میخک تهیه و سپس پودر شد. بعد در الکل مطلق و آب مقطر به میزان ۵۰ درصد ترکیب شد و به مدت ۴۸ ساعت توسط دستگاه شیکر تکان داده شد و پس از

2. Advanced Glycation End Products
3. Reactive Oxygen Species
4. Superoxide dismutase
5. Catalase
6. Syzygium aromaticum
7. Malondialdehyde
8. Streptozotocin
9. Diabetic control
10. گروه دیابتی دریافت کننده گلی بنکلامید

www.SID.ir

آن فیلتر شد و با دور هزار دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از تبخیر آب و الکل پودر به‌دست‌آمده به عنوان عصاره را در نرمال سالین حل کردیم و با دُز ٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم استفاده شد.

فعالیت SOD با استفاده از روش کیت RANSOD (UK) سنجش شد. MDA[11] با قرار دادن پلاسما در یک لوله آزمایش حاوی اسید استیک گلاسیال اندازه‌گیری شد که به آن تیوباربیتوریک اسید ۱ درصد و ۲ درصد NaOH اضافه شد. حجم مساوی (٦۰۰ میکرولیتر در لیتر) محلول‌های اسید استیک گلاسیال و تیوباربیتوریک اسید به ٤۰ میکرولیتر پلاسما اضافه شد. سپس لوله آزمایش حاوی مخلوط، به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن، جذب در ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. سطح MDA با استفاده ازضریب جذب MDA-TBA محاسبه شد (ε = ۱,۵٦ × ۱۰۵ M-Cm-1-1) [۱۵،۱۳].

سطح سرمی GPT با استفاده از کیت پارس‌آزمون (ایران) اندازه‌گیری شد. درنهایت، داده‌های حاصل از این آزمایش با آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند و از آزمون توکی برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف معنی‌دار استفاده شد (P<۰/۰۵). در این مطالعه داده‌ها به صورت میانگین و انحراف معیار ارائه شد.

یافته‌ها

قندخون ناشتا

میزان قند خون ناشتا در گروه DC در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). همچنین میزان قند خون ناشتا در گروه های DG، DC و DSA کاهش معنی‌داری در گروه های DG و DSA در مقایسه با گروه DC نشان داد (۰/۰۵>P) (تصویر شماره ۱).

سطح سرمی انسولین

در همه گروه‌های DC، DG و DSA در مقایسه با گروه کنترل، میزان انسولین سرم به طور معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵) و همچنین در گروه‌های DG و DSA نسبت به گروه DC میزان انسولین افزایش یافته است. این افزایش در گروه DSA معنی‌دار بود (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۲).

سطح سرمی پروفایل چربی

سطح سرمی کلسترول

سطح کلسترول سرم در گروه DC به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). همچنین میزان کلسترول در گروه‌های DG و DSA در مقایسه با گروه DC به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۱).

سطح سرمی لیپوپروتئین کم‌چگالی (LDL)[12]

در گروه DC نسبت به گروه کنترل سطح سرمی LDL به میزان کمی افزایش یافته است (P<۰/۰۵) همچنین، سطح LDL در گروه‌های DG و DSA در مقایسه با گروه DC به طور معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۱).

سطح سرمی لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)[13]

سطح سرمی HDL در گروه DC نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است (P<۰/۰۵). همچنین در گروه‌های DG و DSA نسبت به گروه DC به طور معنی‌داری افزایش یافت

11. Acetic Acid Glacial

12. Low-density lipoprotein
13. High-density lipoprotein

جدول ۱. نتایج پروفایل لیپیدی در سرم خون

گروه	میانگین±انحراف معیار			
	لیپوپروتئین با چگالی کم	لیپوپروتئین با چگالی زیاد	کلسترول	تری‌گلیسرید
کنترل سالم	۱۹/۴۸۰۷±۰/۷۲۶*	۳۴/۸۴۱۲±۰/۵۷*	۶۴/۰۱۵۰±۲/۲۳*	۳۸/۵۹۶۵±۱/۵۸*
دیابتی کنترل	۲۵/۲۶۱۴±۱/۲۶	۲۷/۸۷۰۰±۱/۱۳	۸۳/۱۶۱۷±۲/۱۳	۶۲/۳۷۴۸±۳/۵۸
دیابتی+عصاره میخک	۱۳/۸۹۶۸±۲/۰۹*	۴۳/۶۹۰۰±۱/۶۲*	۵۹/۰۱۹۱±۳/۹۷*	۴۴/۶۵۴۱±۵/۱۴*
دیابتی+گلیبنکلامید	۸/۶۱۰۰±۲/۵۷*	۳۰/۹۲۲۲±۰/۶۸*	۷۲/۹۴۲۶±۳/۶۵*	۴۰/۶۷۰۹±۰/۸۳۵*

افق دانش

گروه کنترل سالم: گروه سالم که تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، گروه کنترل دیابتی: تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+عصاره میخک : گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره میخک به میزان ۴ mg/kg(به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+گلیبنکلامید: گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره گلیبنکلامید به میزان ۵ mg/kg (به مدت ۲۰ روز). *: با گروه کنترل دیابتی تفاوت معنی‌داری دارد.

www.SID.ir

جدول ۲. نتایج مارکرهای استرس اکسیداتیو در سرم خون

گروه	میانگین±انحراف معیار		
	SOD	GPX	MDA
کنترل سالم	۲/۴۰۷±۰/۱۱	۳۱۲/۳۵±۱/۵۷*	۱/۴۷۸±۰/۱۱
دیابتی کنترل	۱/۰۲۹±۰/۲۲	۹۵/۸۰±۱/۱۳	۲/۲۷۲±۰/۲۹
دیابتی+عصاره میخک	۲/۳۵۱±۰/۱۷*	۲۲۶/۱۰±۲/۵۶*	۱/۶۴۳±۰/۱۱*
دیابتی+گلیبنکلامید	۲/۱۷۹±۰/۲۱*	۱۸۰/۲۲±۱/۴۸*	۱/۸۵۹±۰/۲۰*

افق دانش

گروه کنترل سالم: گروه سالم که تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، گروه کنترل دیابتی: که تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+عصاره میخک :گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره میخک به میزان ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم (به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+گلیبنکلامید: گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره گلیبنکلامید به میزان ۵میلی‌گرم بر کیلوگرم (به مدت ۲۰ روز). *: با گروه کنترل دیابتی تفاوت معنی‌داری دارد.

(P<۰/۰۵). از طرف دیگر، سطح HDL در گروه DSA به طور قابل توجهی بالاتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۱).

سطح سرمی تری‌گلیسیرید (TG)[14]

سطح سرمی TG در گروه DC نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافته است (P<۰/۰۵). علاوه بر این، سطح TG در گروه DSA در مقایسه با گروه DC به طور قابل توجهی کاهش یافته است (P<۰/۰۵). (جدول شماره ۱).

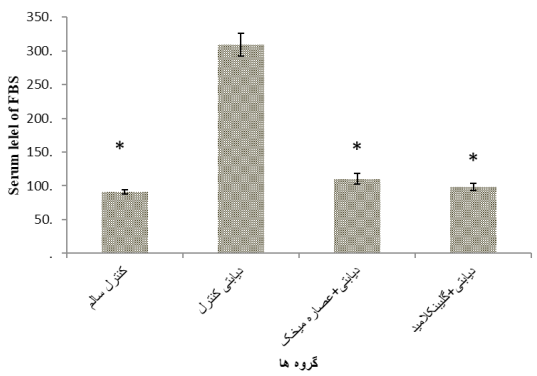
مارکرهای استرس اکسیداتیو

در جدول شماره ۲ سطح سرمی SOD، GPx و MDA نشان داده شده است. فعالیت آنزیم GPx و SOD در گروه کنترل دیابتی به طور قابل توجهی پایین‌تر از گروه سالم بود (P<۰/۰۵). اما، درمان با عصاره میخک فعالیت سرمی GPx و SOD را در مقایسه با گروه دیابت کنترل افزایش داد (P<۰/۰۵). در گروه کنترل دیابتی سطح سرمی MDA نسبت به گروه سالم به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). از طرفی در گروه‌های تحت درمان با عصاره میخک صدپر نسبت به گروه دیابت کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۲).

آسیب‌شناسی بافتی کبد

بافت کبد به‌دست‌آمده از گروه سالم، از نظر هیستولوژیک طبیعی بود. مطالعات بافت‌شناسی نشان داد که دیابت منجر به تغییرات دژنراتیو مانند ادم، پارگی، خون‌ریزی در رگ‌های

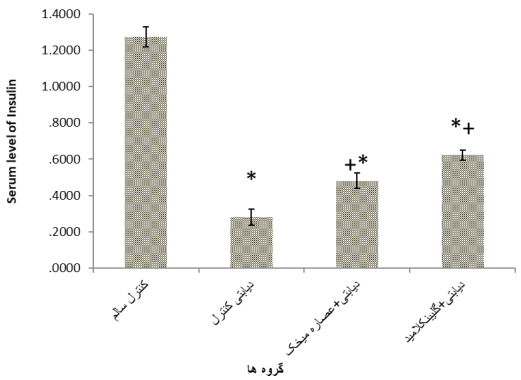
14. Triglycerides



تصویر ۱. نمودار سطح سرمی قند ناشتا در گروه‌های مطالعه

افق دانش

گروه کنترل سالم: گروه سالم که تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، گروه کنترل دیابتی: تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+عصاره میخک: گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره میخک به میزان ۴میلی‌گرم بر کیلوگرم (به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+گلیبنکلامید: گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره گلیبنکلامید به میزان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (به مدت ۲۰ روز). *: با گروه کنترل دیابتی تفاوت معنی‌داری دارد.

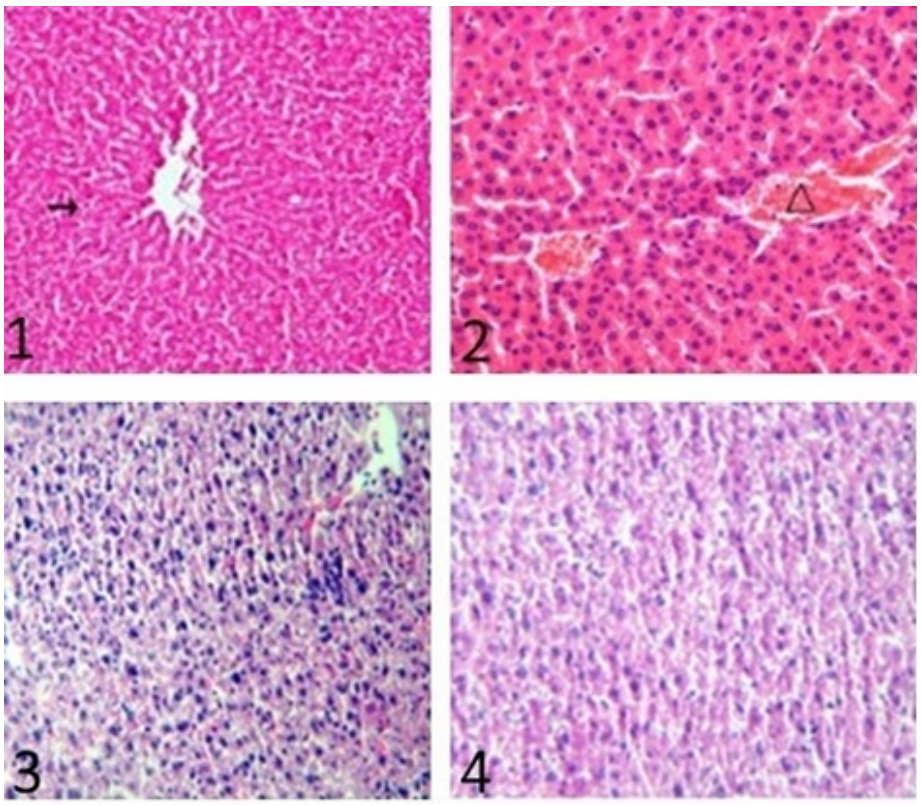


تصویر ۲. نمودار سطح انسولین سرمی در گروه‌های مطالعه

افق دانش

گروه کنترل سالم: گروه سالم که تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، گروه کنترل دیابتی: تحت درمان با نرمال سالین قرار گرفته‌اند (به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+عصاره میخک: گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره میخک به میزان ۴میلی‌گرم بر کیلوگرم (به مدت ۲۰ روز)، دیابتی+گلیبنکلامید: گروه دیابتیک درمان‌شده با عصاره گلیبنکلامید به میزان ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (به مدت ۲۰ روز). علامت * نشان‌دهنده معناداری با گروه کنترل سالم؛ علامت+نشان‌دهنده معناداری با گروه کنترل دیابت می‌باشد.

www.SID.ir



تصویر ۳. بررسی نتایج بافت شناسی کبد. بزرگ‌نمایی X۱۰۰

افق دانش

۱. تصویر مقطع بافتی مربوط به گروه کنترل سالم، ۲. تصویر مقطع بافتی مربوط به گروه کنترل دیابتی، ۳. تصویر مقطع بافتی مربوط به گروه دیابتی درمان‌شده با عصاره میخک، ۴. تصویر مقطع بافتی مربوط به گروه دیابتی دریافت‌کننده گلیبنکلامید.

فلش سیاه نشان‌دهنده قسمت‌های خون‌ریزی بافتی است. فلش قرمز نشان‌دهنده سینوزوئید گشادشده است. فلش نارنجی نشان‌دهنده ورید مرکزی است.

مرکزی، گشاد شدن در سینوسوئیدها و هسته‌های پیکنوتیک می‌شود. اما، تغییرات دژنراتیو ذکر شده در گروه‌های درمانی کاهش یافته است (تصویر شماره ۳).

بحث

استرپتوزوتوسین ترکیبی است که معمولاً برای القای دیابت نوع ۱ در موش‌های صحرایی استفاده می‌شود [۱۶]. استرپتوزوتوسین با کاهش سریع سلول‌های بتای لوزالمعده باعث ایجاد دیابت شده، که درنهایت منجر به کاهش ترشح انسولین می‌شود. به‌خوبی مشخص شده است که گلیبنکلامید با افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتای موجود در لوزالمعده، باعث ایجاد هیپوگلیسمی می‌شود. این ترکیب در دیابت متوسط ناشی از STZ (تعدادی از سلول‌های بتا هنوز سالم اند) فعال است، در حالی که در دیابت شدید STZ (که تقریباً در تمام سلول‌های بتا از بین رفته‌اند) غیرفعال می‌شود [۱۷]. نتایج ما نشان داد که گلیبنکلامید سطح قند خون ناشتا (FBS)[15] را در حیوانات هیپرگلیسمیک کاهش می‌دهد، بنابراین وضعیت دیابت در حیوانات مورد استفاده متوسط بود. اثرات هیپوگلیسمی عصاره‌های گیاهی به میزان تخریب سلول‌های بتای لوزالمعده بستگی دارد. درمان موش‌های صحرایی دیابتی متوسط با عصاره گیاه دارویی، منجر به فعال شدن سلول‌های بتا و افزایش تولید انسولین شد [۱۸]. فعالیت آنتی‌هیپرگلیسمیک عصاره میخک صدپر، با افزایش انسولین پلاسما همراه بود که نشان می‌دهد فعالیت آنتی‌هیپرگلیسمیک عصاره میخک صدپر می‌تواند به دلیل فعالیت انسولینزای این عصاره باشد. افزایش سطح انسولین مشاهده‌شده در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره میخک صدپر می‌تواند منجر به ترشح انسولین از بقایای سلول‌های بتا و یا سلول‌های بتای بازسازی‌شده شود. همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد عصاره میخک صدپر در اثر افزایش ترشح انسولین، میزان قند خون ناشتا را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد [۱۹].

دیابت در تعداد زیادی از مسیرهای متابولیکی از جمله متابولیسم لیپیدها تأثیر می‌گذارد. کمبود انسولین (دیابت نوع ۱) یا کاهش عملکرد انسولین (دیابت نوع ۲) منجر به کاهش مصرف گلوکز توسط بافت هایی که به انسولین نیاز دارند (مانند

15. Fasting Blood Sugar

www.SID.ir

کبد) و همچنین افزایش تولید گلوکز از طریق افزایش میزان گلوکونوژنز شده که درنهایت منجر به افت قند خون می‌شود. در اثر افزایش گلوکز و کاهش سطح انسولین در پلاسمای خون، تنظیم کبدی متابولیسم لیپید بسیار تغییر می‌کند. از آنجا که انسولین تنظیم‌کننده مهمی در بسیاری از آنزیم‌های درگیر در لیپولیز و لیپوژنز است، کمبود آن باعث ایجاد تغییرات عمده‌ای در فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود و درنتیجه بر متابولیسم کلی چربی‌ها و پروفایل چربی در بافت‌های مختلف تأثیر می‌گذارد [۲۰].

در دیابت ناشی از STZ، افزایش سطح قند خون معمولاً با افزایش کلسترول پلاسما، تری‌گلیسیرید و لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL) همراه است و لیپوپروتئین با چگالی زیاد (HDL) کاهش می‌یابد [۲۱]. فعال‌سازی لیپاز حساس به هورمون در هنگام کمبود انسولین با آزادسازی اسیدهای چرب آزاد (FFAs)[16] از بافت چربی همراه است [۲۲]. بنابراین، اسیدهای چرب اضافی تولیدشده توسط دیابت ناشی از STZ در پلاسما، تبدیل اسیدهای چرب اضافی به فسفولیپیدها و کلسترول را در کبد تقویت می‌کند. این دو ماده به همراه تری‌گلیسیریدهای اضافی که در کبد تشکیل شده است، ممکن است به شکل لیپوپروتئین به درون خون تخلیه شوند [۱۶].

مشاهدات ما نشان داد که عصاره میخک به‌تنهایی و همراه با گلیبنکلامید باعث کاهش معنی‌دار کلسترول پلاسما، تری‌گلیسیرید و لیپوپروتئین با چگالی کم در گروه‌های دیگر نسبت به گروه کنترل دیابتی شد. همچنین، عصاره میخک صدپر باعث افزایش لیپوپروتئین با چگالی زیاد نسبت به گروه کنترل دیابتی شد (جدول شماره ۱). عصاره میخک صدپر احتمالاً از طریق کنترل متابولیسم لیپید، وضعیت لیپید پلاسما را به سطح نرمال برگرداند. این نتایج، در توافق با نتایج مطالعه‌های گذشته بود [۲۴،۲۳].

مشاهدات ما نشان داد میخک صدپر باعث افزایش معنی‌دار GPx، و SOD در گروه‌های دیگر نسبت به گروه کنترل شد (جدول شماره ۲). یکی از روبنده‌های سیتوپلاسمی رادیکال‌ها که می‌تواند رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد گلوتاتیون (GSH)[17] است [۲۵]. به طور کلی اعتقاد بر این است که اثر محافظتی GSH در برابر تجزیه اکسیداتیو لیپیدها، از طریق GPx با کاهش هیدروپراکسیدهای تشکیل‌شده درون‌زای اسیدهای چرب اشباع نشده (PUFA)[18] و تبدیل به مشتقات هیدروکسیل انجام می‌شود [۲۶]. گلوتاتیون (GSH) می‌تواند با تشکیل کاتالیزورهای فلزدار به طور موقت، شکستن واکنش‌های زنجیره‌ای، کاهش غلظت گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن (ROS)[19] و افزایش سطح آنزیم‌های دخیل در سیستم آنتی‌اکسیدانی (GPx، CAT، SOD و GST) مانع از تولید رادیکال آزاد شود [۲۸،۲۷]. سلنیوم یک کوفاکتور مهم برای آنزیم SOD است [۲۹] و استفاده از عصاره عصاره میخک صدپر در موش‌های صحرایی باعث افزایش سلنیوم، کاهش استرس اکسیداتیو و آسیب کبدی می‌شود. نتایج مشابه در مطالعه آدفگا[20] و همکاران مشاهده شد [۸] که نشان می‌داد واکنش فنتون ترکیبی از H2O2 و Fe2+ است که به طور مکرر برای القای واکنش‌های لیپوکسیژناز (LPO)[21] استفاده می‌شود [۳۰]. LPO هیدروژن را که قدرتمندترین اکسیدان در سیستم بیولوژیکی است از PUFA و رادیکال هیدروکسیل آزاد می‌کند و می‌تواند از هیدروژن جداسازی شده از PUFA استفاده کرده و باعث افزایش استرس اکسیداتیو شود [۲۹].

فعالیت آنتی‌اکسیدانی میخک صدپر ممکن است به دلیل ترکیبات فنولیک مانند اوژنول، اوژنول استات و تیمول باشد [۳۱]. میخک صدپر می‌تواند از طریق پاک کردن رادیکال‌های آزاد، شلات کردن یون‌های موقت فلز، مهار آنزیم‌های اکسیدان و یا از طریق ترمیم α-توکوفرول و رادیکال α-توکوفوکسسیل، از آسیب دیدن سلول‌ها جلوگیری کند [۳۲]. همچنین، فلاونوئیدها می‌توانند رادیکال‌های OH، O2 و پراکسیل را از بین ببرند و از فعالیت LPO جلوگیری کنند [۳۳]. میخک صدپر می‌تواند GSH، GPx، SOD را افزایش داده و MDA را کاهش دهد [۳۴]. هایپرگلیسمی و هایپرلیپیدمی در بیماران دیابتی با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است [۳۵] و افزایش سطح MDA در موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۲ نشان می‌دهد که پراکسیداسیون لیپید افزایش‌یافته منجر به آسیب بافتی و عدم توانایی مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای جلوگیری از حمله رادیکال آزاد می‌شود که ممکن است منجر به نشت آنزیم‌ها و متابولیت‌ها به گردش خون شود [۳۶].

افزایش سطح آنزیم‌هایی مانند ALT و AST، نشانگر آسیب‌های کبدی است و ارزیابی AST و ALT، به ترتیب شاخصی از وضعیت کبدی و سلول‌های نکروتیک را نشان می‌دهد [۳۷]. همچنین سطح غیرطبیعی آلکالین فسفاتاز در خون می‌تواند نشان‌دهنده مشکلاتی مربوط به کبد و یا استخوان‌ها باشد [۳۸]. در مطالعه حاضر، افزایش سطح AST، ALT و ALP در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بالا بود. همچنین در گروه درمانی با میخک صدپر کاهش معنی‌داری در سطح AST و ALT نسبت به گروه دیابتی مشاهده شد. در مطالعات گذشته، افزایش میزان آنزیم‌های ALT و AST در بیماران دیابتی مشاهده شده بود [۴۰، ۳۹]. نیبلوم[22] و همکاران نشان دادند که در بیماران مبتلا به بیماری کبد الکلی پیشرونده، آنزیم‌های کبدی مانند AST و

16. Free Fatty Acid
17. Glutathione
18. Polyunsaturated Fatty Acid
19. Reactive Oxygen Species
20. Adefegha
21.Lipoxygenase
22. Nyblom

www.SID.ir

ALT افزایش می‌یابد [۴۱]. میخک صدپر با افزایش آنزیم‌های موجود در سیستم آنتی‌اکسیدانی (SOD، CAT، GPX) و کاهش استرس اکسیداتیو می‌تواند آسیب کبدی را کاهش دهد [۴۲، ۴۳]. همچنین، نتایج بافت‌شناسی کبد در این مطالعه نشان داد که عصاره میخک صدپر آسیب بافت کبدی ناشی از دیابت را کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره میخک صدپر، دارای اثرات مفید در کاهش قند خون، استرس اکسیداتیو، کلسترول پلاسما، تری‌گلیسیرید و لیپوپروتئین با چگالی کم است. همچنین میخک صدپر به افزایش سطح انسولین خون و بهبود آسیب بافتی کبد کمک کرده و دارای اثرات مفید در جهت کاهش آسیب بافتی ناشی از دیابت است. بنابراین با توجه به این اثرات مفید گیاه میخک صدپر، می‌توان از آن به عنوان داروی گیاهی مؤثر در کاهش و درمان عوارض ناشی از دیابت و تأثیر آن‌ها بر بافت کبد، استفاده کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کد اخلاق این پژوهش (IR.TBZMED.VCR.REC.1397.167) از کمیته اخلاق طرح‌های پژوهشی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز اخذ شده است.

حامی مالی

این مقاله محصول طرح پژوهشی درباره رت‌های دیابتی و مصوب کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز بوده است و بدون دریافت کمک مالی انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

ایده اصلی: طلا پورلک و منیره حلیمی؛ نگارش مقاله، تأیید نهایی مقاله: طلا پورلک، منیره حلیمی، طناز پورلک، پرهام معروفی، صابر قادر پور و عارفه شکوهی؛ جمع‌آوری و تفسیر داده ها: طلا پورلک، صابر قادر پور و عارفه شکوهی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز و کمیته تحقیقات دانشجویی علوم‌پزشکی تبریز تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

References

[1] Inzucchi SE, Sherwin RS. Goldman's cecil medicine. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011. [DOI:10.1016/B978-1-4377-1604-7.00237-2]

[2] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2014; 37 Suppl 1:S81-90. [DOI:10.2337/dc14-S081] [PMID]

[3] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. Diabetic Medicine. 1998; 15(7):539-53. DOI:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:73.0.CO;2-S] [PMID]

[4] Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. Pharmacological Reports. 2005; 57(1):90-6. [DOI:10.1385/BTER:108:1-3:185]

[5] Lans CA. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2006; 2:45. [DOI:10.1186/1746-4269-2-45] [PMID] [PMCID]

[6] Abtahi-Evari SH, Shokoohi M, Abbasi A, Rajabzade A, Shoorei H, Kalarestaghi H. Protective efect of Galega officinalis extract on streptozotocin-induced kidney damage and biochemical factor in diabetic rats. Crescent Journal of Medical and Biological Sciences. 2017; 4(3):108-14. https://www.researchgate.net/publication/318773339

[7] Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nature Reviews Immunology. 2011; 11(2):98-107. [DOI:10.1038/nri2925] [PMID]

[8] Adefegha SA, Oboh G, Adefegha OM, Boligon AA, Athayde ML. Antihyperglycemic, hypolipidemic, hepatoprotective and antioxidative effects of dietary clove (Szyzgium aromaticum) bud powder in a high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes rat model. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2014; 94(13):2726-37. [DOI:10.1002/jsfa.6617] [PMID]

[9] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 2003; 17(1):24-38. [DOI:10.1002/jbt.10058] [PMID]

[10] Mohamed J, Nazratun Nafizah AH, Zariyantey AH, Budin SB. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: The role of oxidative stress and inflammation. Sultan Qaboos University Medical Journal. 2016; 16(2):e132-41. [DOI:10.18295/squmj.2016.16.02.002] [PMID] [PMCID]

[11] Donadon V, Balbi M, Mas MD, Casarin P, Zanette G. Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver disease. Liver International. 2010; 30(5):750-8. [DOI:10.1111/j.1478-3231.2010.02223.x] [PMID]

[12] Ukkola O, Erkkilä PH, Savolainen MJ, Kesäniemi YA. Lack of association between polymorphisms of catalase, copper-zinc Superoxide Dismutase (SOD), extracellular SOD and endothelial nitric oxide synthase genes and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes mellitus. Journal of Internal Medicine. 2001; 249(5):451-9. [DOI:10.1046/j.1365-2796.2001.00828.x] [PMID]

[13] Moghimian M, Abtahi-Evari SH, Shokoohi M, Amiri M, Soltani M. Effect of Syzygium aromaticum (clove) extract on seminiferous tubules and oxidative stress after testicular torsion in adult rats. Physiology and Pharmacology. 2017; 21(4):343-50. http://ppj.phypha.ir/article-1-1257-en.html

[14] Lee KG, Shibamoto T. Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. Food and Chemical Toxicology. 2001; 39(12):1199-204. [DOI:10.1016/S0278-6915(01)00078-3]

[15] Moghimian M, Abtahi-Eivary SH, Jajarmy N, Karimi Shahri M, Adabi J, Shokoohi M. Comparing the effect of flaxseed and fish oils on acute ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. Crescent Journal of Medical and Biological Sciences. 2019; 6(1):6-12. http://www.cjmb.org/uploads/pdf/pdf_CJMB_143.pdf

[16] Rajasekaran S, Ravi K, Sivagnanam K, Subramanian S. Beneficial effects of Aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2006; 33(3):232-7. [DOI:10.1111/j.1440-1681.2006.04351.x] [PMID]

[17] Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. Diabetes. 2002; 51 Suppl 3:S368-76. [DOI:10.2337/diabetes.51.2007.S368] [PMID]

[18] Kedar P, Chakrabarti CH. Effects of bittergourd (Momordica charantia) seed & glibenclamide in streptozotocin induced diabetes mellitus. Indian Journal of Experimental Biology. 1982; 20(3):232-5. [PMID]

[19] Chaudhry ZR, Chaudhry SR, Naseer A, Chaudhry FR. Effect of Syzygium aromaticum (clove) extract on blood glucose level in streptozotocin induced diabetic rats. Pakistan Armed Forces Medical Journal. 2013; 63(3):323-8. https://inis.iaea.org/search/searchsinglerecord.aspx?recordsFor=SingleRecord&RN=45041146

[20] Yadav UCS, Moorthy K, Baquer NZ. Effects of sodium-orthovanadate and Trigonella foenum-graecum seeds on hepatic and renal lipogenic enzymes and lipid profile during alloxan diabetes. Journal of Biosciences. 2004; 29(1):81-91. [DOI:10.1007/BF02702565] [PMID]

[21] Mitra SK, Gopumadhavan S, Muralidhar TS, Anturlikar SD, Sujatha MB. Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated haemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. Indian Journal of Experimental Biology. 1995; 33(10):798-800. [PMID]

[22] al-Shamaony L, al-Khazraji SM, Twaij HA. Hypoglycaemic effect of Artemisia herba alba. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. Journal of Ethnopharmacology. 1994; 43(3):167-71. [DOI:10.1016/0378-8741(94)90038-8] [PMID]

[23] Jung CH, Ahn J, Jeon TI, Kim TW, Ha TY. Syzygium aromaticum ethanol extract reduces highfat diet-induced obesity in mice through downregulation of adipogenic and lipogenic gene expression. Experimental and Therapeutic Medicine. 2012; 4(3):409-14. [DOI:10.3892/etm.2012.609] [PMID] [PMCID]

[24] Shyamala MP, Venukumar MR, Latha MS. Antioxidant potential of the Syzygium aromaticum (Gaertn.) Linn.(cloves) in rats fed with high fat diet. Indian Journal of Pharmacology. 2003; 35(2):99-103. https://www.researchgate.net/publication/266091697

[25] Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training. Journal of Applied Physiology. 1988; 64(4):1333-6. [DOI:10.1152/jappl.1988.64.4.1333] [PMID]

[26] Fujiwara Y, Kondo T, Murakami K, Kawakami Y. Decrease of the inhibition of lipid peroxidation by glutathione-dependent system in erythrocytes of non-insulin dependent diabetics. Klinische Wochenschrift. 1989; 67(6):336-41. [DOI:10.1007/BF01741388] [PMID]

[27] Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. Annals of Botany. 2003; 91 Spec No(2):179-94. [DOI:10.1093/aob/mcf118] [PMID] [PMCID]

[28] Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2005; 16(10):577-86. [DOI:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013] [PMID]

www.SID.ir

[29] Yadav AS, Bhatnagar D. Modulatory effect of spice extracts on iron-induced lipid peroxidation in rat liver. Biofactors. 2007; 29(2-3):147-57. [DOI:10.1002/biof.552029205] [PMID]

[30] Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates: Is it a mechanism for hydroxyl radical production in biochemical systems? FEBS Letters. 1978; 92(2):321-6. [DOI:10.1016/0014-5793(78)80779-0] [PMID]

[31] Nassar MI, Gaara AH, El-Ghorab AH, Farrag ARH. Chemical constituents of clove (Syzygium aromaticum, Fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity. Revista Latinoamericana de Quimica. 2007; 35(3):47-57. https://www.researchgate.net/publication/228357516

[32] Pulikottil SJ, Nath S. Potential of clove of Syzygium aromaticum in development of a therapeutic agent for periodontal disease: A review. South African Dental Journal. 2015; 70(3):108-15. http://www.scielo.org.za/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0011-85162015000300010

[33] Van Acker ASBE, Van Den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Van Bennekom WP, Van Der Vijgh WJF, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology and Medicine. 1996; 20(3):331-42. [DOI:10.1016/0891-5849(95)02047-0]

[34] Shukri R, Mohamed S, Mustapha NM. Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. Food Chemistry. 2010; 122(4):1116-21. [DOI:10.1016/j.foodchem.2010.03.094]

[35] Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: Role of oxidative stress. Circulation. 2002; 106(16):2067-72. [DOI:10.1161/01.CIR.0000034509.14906.AE] [PMID]

[36] Ozdemır G, Ozden M, Maral H, Kuskay S, Cetinalp P, Tarkun I. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. Annals of Clinical Biochemistry. 2005; 42(Pt 2):99-104. [DOI:10.1258/0004563053492838] [PMID]

[37] Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. New England Journal of Medicine. 2006; 354(7):731-9. [DOI:10.1056/NEJMra052270] [PMID]

[38] Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. Current Opinion in Orthopaedics. 2007; 18(5):444-8. [DOI:10.1097/BCO.0b013e3282630851]

[39] Vozarova B, Stefan N, Lindsay RS, Saremi A, Pratley RE, Bogardus C, et al. High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. Diabetes. 2002; 51(6):1889-95. [DOI:10.2337/diabetes.51.6.1889] [PMID]

[40] Hanley AJ, Williams K, Festa A, Wagenknecht LE, D'Agostino RB Jr, Kempf j, et al. Elevations in markers of liver injury and risk of type 2 diabetes: The insulin resistance atherosclerosis study. Diabetes. 2004; 53(10):2623-32. [DOI:10.2337/diabetes.53.10.2623] [PMID]

[41] Nyblom H, Berggren U, Balldin J, Olsson R. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. Alcohol and Alcoholism. 2004; 39(4):336-9. [DOI:10.1093/alcalc/agh074] [PMID]

[42] Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. Antioxidant activity of clove oil-A powerful antioxidant source. Arabian Journal of Chemistry. 2012; 5(4):489-99. [DOI:10.1016/j.arabjc.2010.09.016]

[43] Sadeek EA, El-Razek FHA. The chemo-protective effect of turmeric, chili, cloves and cardamom on correcting iron overload-induced liver injury, oxidative stress and serum lipid profile in rat models. Journal of American Science. 2010; 6(10):702-12. http://www.jofamericanscience.org/journals/am-sci/am0610/82_3676am0610_702_712.pdf

www.SID.ir