

Evaluation of blood sugar lowering effect of airy organs extract of *Cupressus sempervirens* L. on streptozocin induced diabetic mice

Shaki F¹, Habibi E², Parandavaji M³, Ataee R⁴

1. Assistant Professor of Toxicology, Pharmaceutical Sciences Research center, Hemoglobionopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

2. Assistant Professor of Pharmacognosy, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobionopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

3. Student of Pharmacy, Pharmacy Department, Pharmacy School, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

4. Assistant Professor of Pharmacology, Thalassemia Research Center, Pharmaceutical Sciences Research Center Hemoglobionopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (Corresponding Author), Tel: +98-11 33543083, Email: raminataee1349@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aim: Cupressus extract has been considered as antioxidant and free radical scavenger. In this study we evaluated the effect of hydroalcoholic extract of Cupressus sempervirens L. on blood sugar, weight and also oxidative stress parameters in experimental diabetic model of mice.

Materials and Methods: 48 male mice of albino race were made diabetic with a single dose of streptozocin (200mg/kg IP injection) for every mouse, and divided into 6 groups of 8 including: positive control(diabetic),negative control (DMSO 10% in normal saline, metformin(100mg.kg),three test groups(which received 50,100,200 mg.kg of the extract respectively by gavage for three weeks). After the treatment period, blood glucose level, weight and oxidative stress parameters such as MDA,GSH and mitochondria proliferation were measured. Using SPSS software 21, data were analyzed by ANOVA and Mann - Whitney statistical analysis.

Results: Our results showed that use of hydroalcoholic extract of Cupressus sempervirens L. reduced blood sugar in a dose dependent way ($P<0.01$) but there was no significant change in the weights of the mice ($P>0.05$) and we found decreased oxidative stress parameters and improved hepatic mitochondrial proliferation ($P<0.01$).

Conclusion: According to the results of this study we can conclude that Cupressus sempervirens L. extract can be effective in reduction of blood glucose and prevention of diabetic induced damage to the liver tissue.

Keywords: Cupressus sempervirens L, Diabetes, Oxidative stress, Streptozocin, Metformin

Received: Nov 4, 2018

Accepted: March 6, 2019

How to cite the article: Shaki F, Habibi E, Parandavaji M, Ataee R. Evaluation of blood sugar lowering effect of airy organs extract of Cupressus sempervirens L. on streptozocin induced diabetic mice. SJKU 2019;24(2):52-65.

بررسی اثر کاهندگی قند خون عصاره اندام هوایی سرو زربین (Cupressus Sempervirens) بر موش دیابتی شده توسط استرپتوزوسین

فاطمه شکی^۱، عمران حبیبی^۲، مسعود پیران دوجی^۳، رامین عطایی^۴

۱. استادیار سم شناسی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۲. استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۳. دانشجوی دکتری داروسازی، گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۴. استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات تالاسمی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران (مؤلف مسئول)، تلفن

ثابت: ۰۱۱-۳۳۵۴۳۰۸۳، پست الکترونیک: raminataee1349@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: عصاره گیاه سرو به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی و جاروب کننده رادیکال‌های آزاد مطرح است. در این مطالعه عصاره هیدروالکلی سرو زربین در محافظت آسیب بافتی کبدی و کاهش قند خون در دیابت القاء شده توسط استرپتوزوسین در موش سوری مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: این مطالعه یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی بوده و دیابت با تزریق دوز واحد صفاقی ۲۰۰ mg/kg استرپتوزوسین به موش‌های سوری نژاد آلبینو ایجاد و موش‌ها در ۶ گروه ۸ تایی قرار گرفتند و به ترتیب گروه کنترل دیابتی، گروه کنترل منفی، گروه دریافت مت فورمین ۱۰۰ mg/kg و سه گروه که دوزهای ۲۰۰ mg/kg، ۱۰۰، ۵۰ عصاره را دریافت کردند. تمام حیوانات سه هفته بعد از درمان از لحاظ قند خون و وزن بررسی شدند. همچنین بافت کبدی‌شان از لحاظ پارامترهای اکسیداتیو استرس همچون MDA و گلووتاتیول و میزان پرولیفراسیون میتوکندریایی بررسی شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۱ و آزمون‌های ANOVA و Mann Whitney با $P < 0/01$ و $P < 0/05$ مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی سرو زربین باعث کاهش قند خون در موش در روند تقریباً وابسته به دوز می‌گردد ($P < 0/01$)، اما این اثر در وزن موش معنی‌دار نبود ($P > 0/05$) همچنین کاهش پارامترهای اکسیداتیو استرس و بهبود پرولیفراسیون میتوکندریایی کبدی مشاهده شد که قابل مقایسه با متفورمین بود ($P < 0/01$).

نتیجه گیری: یافته‌های ما نشان می‌دهد که عصاره سرو علاوه بر کاهش قند خون باعث اثرات محافظتی بر آسیب‌های بافت کبدی ناشی از دیابت می‌گردد.

کلید واژه‌ها: گیاه سرو زربین، دیابت، استرس اکسیداتیو، استرپتوزوسین، متفورمین

وصول مقاله: ۹۷/۸/۱۳ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۱۲/۵ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵

مقدمه

های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال های هیدروکسیل تولید می شود که با توجه به مراحل احیا، به ترتیب، دارای یک، دو و سه الکترون هستند. همچنین، مولکول های اکسیژن سه تایی، به عنوان دی رادیکال ها، در برخورد با الکترون، می توانند به مولکول های اکسیژن تک تبدیل شوند. رادیکال های اکسیژن می توانند به صورت رادیکال های آلکیل یا پراکسیل، مثلاً در لیپیدها، ایجاد شوند. همچنین نیتریک اکسید می تواند به عنوان یکی از انواع رادیکال های گازی در شرایط بیولوژیک تولید شود. پراکسی نیتريت، گونه غیر رادیکال دوباره فعال شده، از طریق واکنش بین نیتریک اکسید و آنیون های سوپراکسید ایجاد می شود.

نیمه عمر رادیکال های مختلف اکسیژن با یکدیگر تفاوت زیادی دارند و در نتیجه نیاز به مکانیسم های دفاعی متفاوتی برای مقابله با آنها است. بیشترین میزان واکنش های انجام شده با مولکول های هدف در رادیکال های هیدروکسیل اتفاق می افتد، واکنش های مربوط به این رادیکال ها دارای محدودیت انتشار است و این بدان مفهوم است که واکنش ها بیشتر در محل تولید رادیکال ها اتفاق می افتد. برعکس، برخی از رادیکال های پراکسیل تقریباً پایدار هستند و نیمه عمری در حد ثانیه دارند. مولکول های این چنینی می توانند از محل تولید خود انتشار یابند و در نتیجه فعالیت های اکسیداتی خود را می توانند به سایر محل های هدف انتقال دهند (۶، ۷).

آنتی اکسیدانت های مختلف آلفا-لیپوئیک اسید، تورین، استیل-ال-کارنی تین، M40403 و بتاکاروتن اثرات خوبی در جلوگیری از نقص در عملکرد عصب در مدل های نوروپاتی دیابتی از خود نشان دادند (۸، ۷).

با توجه به اینکه طبق آمار در ایران حدود ۲۵۶۶۰۰۰ نفر (۶٪ جمعیت) به دیابت مبتلا هستند و تخمین زده می شود که مشابه کشورهای در حال توسعه این آمار در سال ۲۰۲۵ به ۵۱۱۴۹۰۰ نفر افزایش پیدا کند (۹)، بنابراین با توجه به شیوع

دیابت ملیتوس یکی از مهم ترین مشکلات سلامت انسان ها است که تخمین زده می شود تعداد افراد دیابتی در سال ۲۰۳۰ به صورت قابل ملاحظه ای افزایش پیدا کند (۱). عدم کنترل صحیح قند خون در افراد دیابتی منجر به عوارض شدیدی مثل نوروپاتی، رتینوپاتی و نفروپاتی می شود. نوروپاتی دیابتی به صورت شرایط مختلفی از درد مانند افزایش حساسیت به درد (hyperalgesia) دیده می شود در اکثر عوارض ناشی از بیماری دیابت با نرخ شیوع بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است (۲).

نقص در هدایت عصب حسی و حرکتی و دیگر تظاهرات بالینی ناشی از نوروپاتی دیابتی با افزایش قند خون مزمن در ارتباط است (۲). افزایش قند خون همچنین منجر به افزایش استرس اکسیداتیو (از طریق افزایش تولید رادیکال های آزاد یا نقص در سیستم دفاع آنتی اکسیدانت)، بروز ایسکمی/هایپوکسی در عصب و نقص در فاکتورهای رشد عصبی می شود (۳، ۴).

چندین مطالعه پیشنهاد داده است که استرس اکسیداتیو ممکن است یکی از مهم ترین مسیرهای ایجاد نوروپاتی دیابتی باشد و استرس اکسیداتیو به عنوان مسیر نهایی در ایجاد نوروپاتی دیابتی شناخته شده است و تداخلات فارماکولوژیکی که مهار تولید رادیکال های آزاد را هدف قرار داده اند، اثرات درمانی مفیدی را نشان داده اند (۵) و درمان با آنتی اکسیدانت ها می تواند اختلالات عصبی ناشی از افزایش قند خون جلوگیری کند (۶، ۷).

عدم تعادل بین عوامل اکسیدانت و آنتی اکسیدانت، به طور بالقوه، می تواند منجر به بروز آسیب هایی شود که از آن به نام "استرس اکسیداتیو" یاد می شود. عوامل اکسیدانت به عنوان محصولات طبیعی ناشی از متابولیسم هوای سلولی تولید می شوند اما در شرایط پاتوفیزیولوژیک در سطوحی بیشتر از مقدار طبیعی تولید می شوند. مولکول های اکسیژن می توانند به آب احیا شوند. در مراحل میانی این احیا، آنیون

ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در اتاق حیوانات نگهداری شدند. کار با حیوانات آزمایشگاهی بر اساس پروتکل کمیته اخلاقی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران کد طرح و اخلاق ۱۵۲۹ تنظیم گردید.

اندام هوایی سرو (گل و میوه) از اطراف ساری (کیلومتر ۵ جاده ساری - قائم شهر) جمع‌آوری گردید و پس از تأیید مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ی هر باریومی این گیاه در دانشکده‌ی بیولوژی دانشگاه آزاد قائم شهر نگهداری می‌شود. بخش هوایی گیاه در هوای آزاد و در سایه خشک گردید. اندام خشک شده با استفاده از دستگاه آسیاب پودر شده تا به ذرات با قطر حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر تبدیل شدند. این پودرها به منظور عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت، استرپتوزوسین، تیوباریتوریک اسید، کیت گلوکاتیون، dimethylthiazol-2-yl]-2, diphenyl-، Tris-Hcl (tetrazolium bromide) MTT از شرکت سیگما (آلمان)، مت فورمین از شرکت راموفارمین (ایران)، مانیتول، ساکارز، ان - بوتانول، EDTA Hcl (Ethylenediaminetetraacetic acid) از شرکت MERK (DMSO, Dimethyl sufoxide) از شرکت (آلمان) و اتانول از شرکت الکل طب اراک تهیه شد.

عصاره‌گیری از گیاه سرو

به طور کلی روش استخراج مواد مؤثره موجود در گیاهان به نوع بافت‌های گیاهی و ترکیبات گیاه بستگی دارد. مهم‌ترین و اساسی‌ترین عاملی که باید در استخراج مواد متشکله گیاهان مورد توجه قرار گیرد، حلال است که انتخاب آن با توجه به قسمت‌های مختلف گیاه سرو و نیز مواد متشکله آن صورت گرفت (۱۸). اندام هوایی خشک شده گیاه سرو، پس از خرد نمودن به صورت ذرات ۲ تا ۳ میلی‌متری درآمد. به منظور عصاره‌گیری از اتانول استفاده شد. روش انتخابی برای تهیه‌ی اولین عصاره پرکولاسیون بود. در این روش ۱۰۰ گرم از اندام خشک شده‌ی گیاه با ۳۰۰ میلی‌لیتر

بالای این بیماری و بحث اقتصادی و اجتماعی ناشی از عوارض بیماری، درمان مؤثر با عوارض کم ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر بحث استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف از جمله دیابت مطرح شده است.

گیاه سرو زرین با نام علمی (cupres sussempervirens) سرو زرین (cupres pinophyt) از دسته مخروطیان (pinopsid) راسته‌ی کاجیان (pinales) تیره‌ی سروها (cupressaceae) رده سروناز (cupressus) است؛ که بسیاری از خواص آن از قبیل محافظ از مواد غذایی و ضد میکروبی و... اثبات رسیده است (۱۵۰-۱۰)؛ و دارای اثرات ضد میکروبی و نگهدارنده مواد غذایی و... است. مطالعات مختلف اثرات ضد میکروبی، آنتی اکسیدانتی، آنتی کانسری و محافظت کبدی این گیاه را نشان داده است (۱۵-۱۰).

همچنین بسیاری از مطالعات نشان داد که کاهش استرس اکسیداتیو ممکن است باعث مهار نوروپاتی دیابتی می‌شود (۱۷، ۱۶)؛ بنابراین با توجه به اثرات آنتی اکسیدانتی و کاهش قند این گیاه، برای اولین بار به بررسی اثربخشی عصاره هیدروالکلی برگ‌های گیاه سرو در استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوسین و تأثیر آن در روند درمان به عنوان داروی کمکی در کنار داروهای استاندارد درمان دیابت مثل متفورمین می‌پردازیم.

روش بررسی

حیوانات

موش‌های سوری با نژاد Albino نر به وزن ۲۵-۳۰ گرم از مجتمع پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه و در شرایط مناسب رطوبت و دما (دمای ۲۷- ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵-۶۰٪) و سیکل ۱۲

(به صورت محلول در ۱۰٪ DMSO) به مدت ۳ هفته دریافت داشتند. گروه ۱۰-۸ موش دیابتی به مدت ۳ هفته داروی مت فورمین را در دوز 100mg/kg به مدت ۶ هفته دریافت کردند. تمام حیوانات قبل از القاء دیابت و نیز دو هفته بعد از القاء و در هفته‌های ۲ و ۴ و ۶ بعد از دادن عصاره، از لحاظ قند خون و وزن و میزان بیومارکرهای استرس اکسیداتیو بافت کبدی بررسی گردیدند (گلوکوتایون، لیپیدپراکسیداسیون و viability سلول‌ها). در طی مدت تحقیق حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری - تاریکی ۱۲ ساعته) قرار داشتند. میانگین وزن بدن و قند خون موش‌ها در گروه‌های مختلف با استفاده از آزمون‌های T-test و ANOVA یک طرفه و متعاقب آن نیومن کولز مورد تجزیه و تحلیل قرار خواهند گرفت.

پس از سپری شدن دوره‌ی درمان، حیوانات با گیوتین کشته شده. بافت کبد آن‌ها خارج و با بافر مانتول شستشو داده شد. سپس با نرمال سالین توسط هموژنایزر دستی هموژن گردید. مقداری از بافت هموژن ابتدا با سرعت ۲۰۰۰X g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. قسمت دیگر نمونه‌های هموژن شده در ۸۰۰Xg و دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی برای اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی و استرس اکسیداتیو استفاده شد (۲۱، ۲۰).

اندازه‌گیری فاکتورهای استرس اکسیداتیو

اندازه‌گیری لیپیدپراکسیداسیون

لیپید پراکسیداسیون یکی از مارکرهای آسیب اکسیداتیو به لیپیدها بوده که بر اساس روش تیوبایتوریک اسید اندازه‌گیری می‌شود بدین ترتیب که به ۰/۲ ml از سوسپانسیون بافتی ۰/۱ ml از معرف TBA شامل HCl) ۰/۵ نرمال TCA ۱۵٪ و TBA ۰/۳٪) اضافه شد و به خوبی مخلوط و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و بعد از سرد شدن به آن ۰/۲ ml n-بوتانل اضافه و

اتانول مخلوط شد؛ مجموعه به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط رها شد. پس از ۲۴ ساعت مجموعه صاف شده و مجدداً اتانول جدید اضافه گردید. عمل استخراج در مجموع ۳ بار تکرار شد. حلال‌ها به کمک دستگاه روتاری در خلأ (در دمای حدود ۳۵ درجه) تبخیر شده و سپس مجموعه به کمک فریز درایر خشک گردید. بدین ترتیب عصاره اتانولی با بازده ۸/۵٪ به دست آمد (۱۹).

روش القاء دیابت

دو هفته پس از اینکه موش‌های سوری‌ها با محیط آشنا شدند، دیابت با تزریق استرپتوزوسین در موش‌های سوری ایجاد شد. استرپتوزوسین در بافر سیترات ۰/۱ مولار، pH ۶/۵ حل شده و با دوز ۲۰۰ mg/kg به روش داخل صفاقی تزریق گردید. گروه کنترل بافر سیترات ۰/۱ مولار، pH ۶/۵ دریافت گردیدند. موش‌ها به مدت ۴۸ ساعت آب‌قند ۱۰ درصد مصرف کرده (۲۰) و سپس آب و غذای معمولی دریافت می‌دارند. قند خون قبل از آزمایش و یک هفته پس از تزریق استرپتوزوسین اندازه‌گیری شده و موش‌هایی که قند خون بالاتر از ۲۰۰ mg/dl داشته باشند به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (۲۰).

گروه‌های مورد آزمایش

موش‌ها به ۸ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند: گروه ۱- کنترل دیابتی: محلول ۱۰٪ DMSO در آب مقطر روزانه یک سی‌سی از طریق گاوژ به مدت ۳ هفته داده شد. لازم به توضیح است که مدت بررسی سه هفته‌ای موش‌های دیابتی یک بررسی روتین دیابت در موش است که اگر موش آب و غذای کافی در این مدت دریافت نماید دچار مرگ‌ومیر نمی‌شود گروه‌های ۲ و ۳ و ۴-به ترتیب دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی سرو (به صورت محلول در ۱۰٪ DMSO) به مدت ۳ هفته دریافت کردند. گروه‌های ۵ و ۶ و ۷-به ترتیب دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره اتیل استاتی سرو

بلورهای بنفش رنگ فورمازان، ۱ میلی لیتر DMSO اضافه کرده و با شدت به هم می‌زنیم تا حل شوند. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول بنفش رنگ را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل کرده و جذب را با پلیت ریدر در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

بر اساس مطالعات موجود و از طریق فرمول حجم نمونه محاسبه شد. در نهایت نتایج برحسب میانگین \pm انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش و همی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS۲۱ انجام شد. تست‌های آماری مورد استفاده شامل one-way ANOVA test با پست تست Tukey و در صورت عدم نرمال بودن داده‌ها از تست Mann Whitney استفاده گردید. حد معناداری $P < 0.05$ تعریف شده است.

یافته‌ها

تأثیر گیاه سرو زربین بر روی میزان قند خون در موش‌های نرمال و دیابتی شده

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گروه تیمار شده با استریتوزوسین نسبت به گروه کنترل (نرمال سالیین) میزان قند خون بالایی داشته (تفاوت معنی‌دار با $P < 0.01$) و گروه‌های تیمار شده با عصاره و متفورمین نسبت به گروه دیابتی حاصل از استریتوزوسین میزان قند خون خیلی پایین داشته که نشان دهنده اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) با گروه استریتوزوسین است (نمودار ۱).

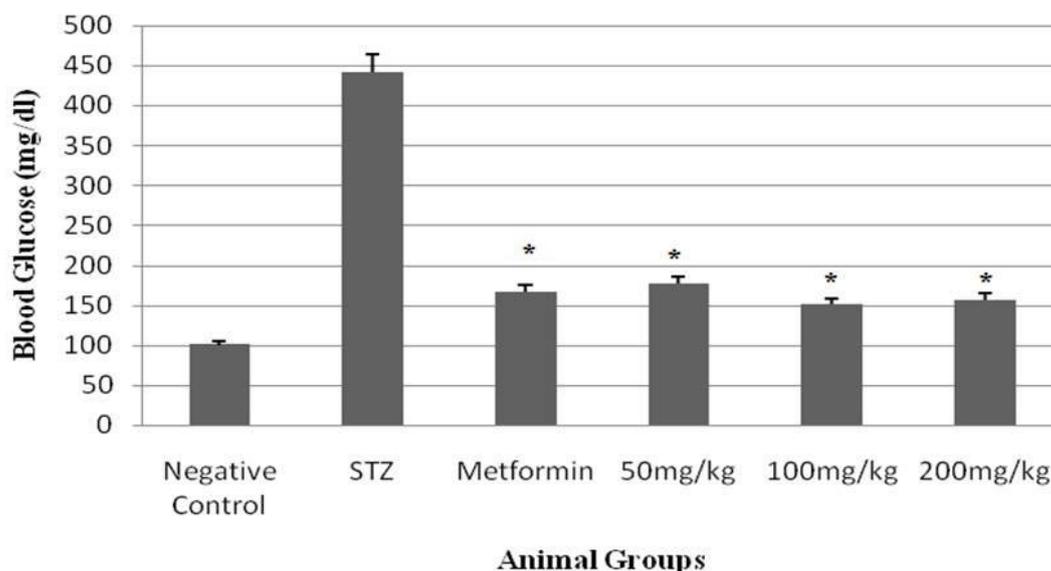
خوب تکان داده شد سپس در $6000 \times g$ به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ شد لایه n - بوتانل برای سنجش در طول موج (نانومتر) ۵۳۲ nm جدا شده و مقدار MDA از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید (۲۱).

اندازه‌گیری سطوح گلوکاتینون

بعد جراحی ۰/۱ گرم از بافت کبد را وزن کرده و به هم‌وزنایز دستی انتقال داده شد، ۱/۵ میلی لیتر EDTA به آن افزوده و خوب هم‌وزن شد، در لوله فالكون به آن ۰/۱۰ EDTA و ۱/۵ TCA cc اضافه شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند، سپس به مدت پانزده دقیقه در دور $3500 \times g$ سانتریفیوژ شد و یک میلی لیتر از محلول رویی را برداشته و به آن ۲/۵ میلی لیتر بافر تریس با $pH=8.9$ (۰/۴ مولار) اضافه شد و سپس ۰/۵ cc DTNB ۰/۴٪ به آن افزوده و ۱۵ دقیقه انکوبه تا واکنش کامل شود، لوله را به‌خوبی هم زده رنگ زرد رنگ مشاهده شد در نهایت جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۱۲ nm قرائت شد (۲۲).

تست MTT

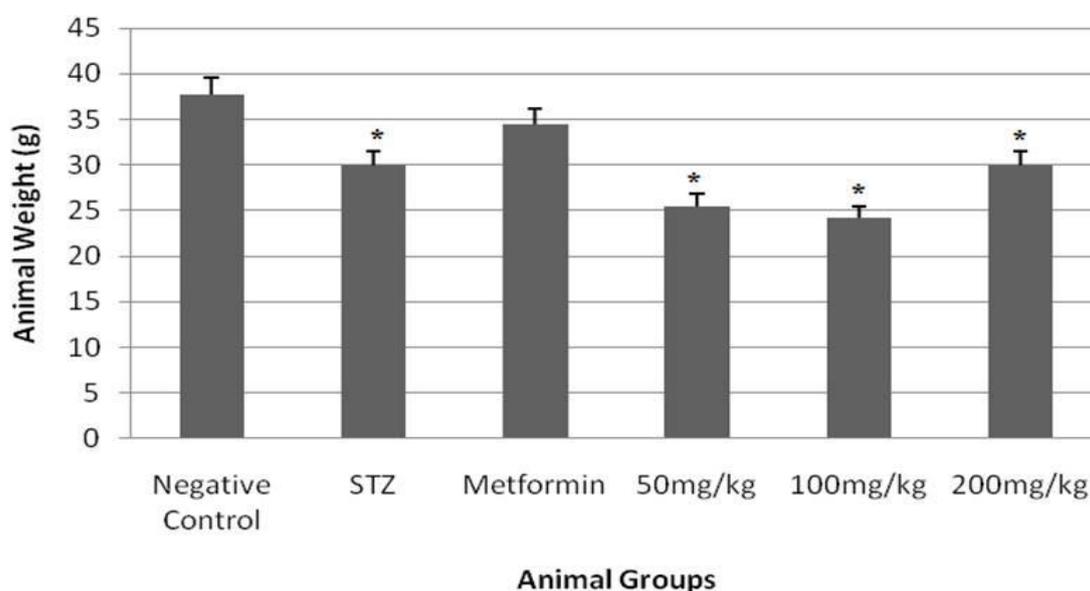
یک میلی لیتر از مخلوط میتوکندری‌های ایزوله شده از بافت کبدی را در دمای ۳۷ درجه با اضافه کردن محلول MTT زردرنگ (۰/۲ میلی گرم / میلی لیتر) به محیط، به مدت یک ساعت انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان انکوباسیون، در $7000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی را دور ریخته و بافر تریس به لوله‌ها اضافه‌شده و دوباره با شرایط قبل سانتریفیوژ شد و در پایان به



نمودار ۱: میزان قند خون در موش‌های تیمار شده با استرپتوزوسین و عصاره هیدروالکلی

*: تفاوت معنی‌دار با گروه استرپتوزوسین ($P < 0.01$)

تأثیر گیاه سرو بر روی تغییر وزن در موش‌های نرمال و دیابتی شده:



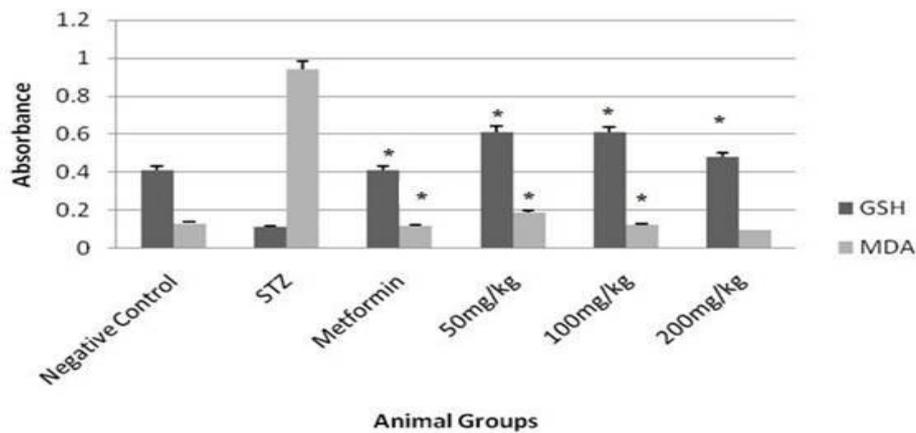
نمودار ۲: میزان تغییر وزن در موش‌های تیمار شده با استرپتوزوسین (دیابتی) و عصاره

*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی ($P < 0.01$)

موش‌های دریافت‌کننده عصاره تغییر وزن معنی‌داری در مقایسه با STZ مشاهده نشد $P > 0.05$ در حالی که متفورمین

همان‌طوری که در نمودار ۲ نشان داده می‌شود گروه دریافت‌کننده نرمال سالیین نسبت به گروه دریافت‌کننده استرپتوزوسین دارای وزن بیشتری است $P < 0.01$ در

نسبت به استرپتوزوسین باعث تغییر معنی دار در وزن گردیده است $P < 0.01$.
 اثر محافظتی گیاه سرو زربین بر میزان اکسیداتیو استرس در موش های نرمال و دیابتی شده:

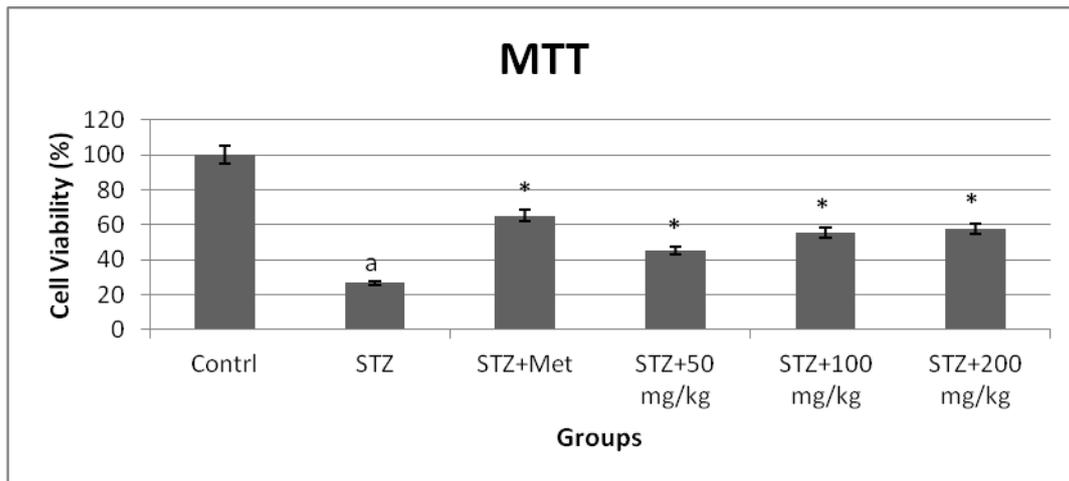


نمودار ۳: میزان گلوکوتاتیون و مالونیل دی آلدئید در بافت کبدی موش های تیمار شده با استرپتوزوسین (دیابتی) و عصاره

*: تفاوت معنی دار با گروه استرپتوزوسین ($P < 0.01$)

نمودار ۴- درصد *viability* میتوکندری کبد در موش های تیمار شده با استرپتوزوسین (دیابتی) و عصاره استرپتوزوسین کمتر بوده که اختلاف معنی دار است ($P < 0.01$).
بررسی میزان *viability* میتوکندری سلول های کبدی در موش های نرمال و دیابتی شده

در نمودار ۳ نشان داده می شود که میزان گلوکوتاتیون در گروه های دریافت کننده عصاره و متفورمین نسبت به گروه استرپتوزوسین بیشتر بوده که دارای اختلاف معنی دار است ($P < 0.01$)؛ و همچنین میزان مالونیل دی آلدئید در گروه های دریافت کننده عصاره و متفورمین نسبت به گروه



مطالعات بالینی اخیر مشخص کرده که هیپرگلیسمی علت مهم پیشرفت و توسعه اختلال عملکرد مغز در افراد دیابتی است از طرفی در افراد دیابتی استرس اکسیداتیو یک نقش کلیدی در پاتوژنز عوارض عروقی بازی می‌کند. رادیکال‌های آزاد نقش مهمی هم در سلامتی و هم در بیماری بازی می‌کنند (۲۵). در مطالعات پیشین نقش استرس اکسیداتیو در پاتولوژی عوارض دیابت در بیماران و یا مدل‌های آزمایشگاهی دیابت نشان داده شده است (۲۴،۲۵).

در مطالعه‌ی ما نیز افزایش لیپید پراکسیداسیون در موش‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده که نشان‌دهنده‌ی اختلال در اکسیداسیون گلوکز ناشی از هایپرگلیسمی است. در بسیاری از مطالعات، میزان لیپیدپراکسیداسیون ناشی از دیابت ارزیابی شده است. در مطالعه‌ای که توسط محبوب و همکاران در سال ۲۰۰۵ بر روی سطوح سرمی لیپیدپراکسیداسیون (مالونیل‌دی‌آلدئید) و آنزیم آنتی‌اکسیدانمی در بیماران دیابت یک زن و مرد در هند انجام گرفت، نتایج حاکی از افزایش غلظت مارکر لیپیدپراکسیداسیون (مالونیل‌دی‌آلدئید) و کاهش گلوکوتایون سرم در هر دو گروه زن و مرد بیماران تیپ دو دیابت در مقایسه با گروه غیردیابت یک بود و نتیجه‌گیری آن‌ها این بود که تغییر در این دو فاکتور ممکن است خیلی زودتر از شروع عوارض ثانویه‌ی دیابت نوع دو اتفاق بیفتد (۲۶).

نمودار ۴: درصد viability میتوکندری سلول‌های کبدی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین با گروه استرپتوزوسین A: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل ($P < 0.01$)
*: تفاوت معنی‌دار با گروه استرپتوزوسین ($P < 0.01$)

همان‌طوری که در نمودار ۴ نشان داده می‌شود درصد viability میتوکندری سلول‌های کبدی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین با گروه استرپتوزوسین دارای اختلاف معنی‌دار است ($P < 0.01$) و درصد viability میتوکندری کبدی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین بیشتر از گروه STZ بوده است ($P < 0.01$).

بحث

دیابت یک بیماری متابولیک بوده که با افزایش اکسیداتیو استرس همراه است و مطالعات مختلف نشان داده‌اند که هایپرگلیسمی در افراد دیابتی باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و استرس اکسیداتیو در بافت مغز و در ادامه آسیب‌های جدی می‌شود (۲۳). در واقع هایپرگلیسمی دیابتی علت اصلی عوارض دیابت است که با افزایش اتواکسیداسیون گلوکز و رادیکال‌های آزاد منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۴)؛ و بنابراین مصرف آنتی‌اکسیدانتها می‌تواند در کاهش عوارض دیابت نقش داشته باشد.

درصد و فعالیت ضد ویروسی در برابر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (hsv-1) داراست (۲۹، ۳۰).

همچنین ورما و همکاران در سال ۲۰۱۴ در پژوهش خود تحت عنوان تأثیر لابدا - ۸ (۱۷) و ۱۲ و ۱۴ -ترین - ۱۹ - اوییک اسید میوه سرو در سرکوب هیپرپلازی خوش خیم پروستات در موش و مدل‌های انسانی از طریق مهار آندروژن و سیگنالینگ stat3 به این نتیجه رسیدند که عصاره میوه سرو باعث مهار تکثیر سلول‌های - استراز و سرکوب عمل آندروژن در پروستات می‌شود (۳۱).

اصغری و همکاران در سال ۲۰۱۲ در پژوهش خود تحت عنوان تجزیه و تحلیل شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی و آنتی باکتریال سرو زربین به این نتیجه رسیدند که عصاره سرو علاوه بر خواص آنتی باکتریال دارای خواص آنتی اکسیدانت و ضد گلوکوزیله شدن نیز است و در پیشگیری از عوارض دیابت و عوارض قلبی - عروقی مؤثر است (۳۱). آزا و همکاران در سال ۲۰۱۴ در پژوهش خود تحت عنوان اثرات آنتی اکسیدانت، ضد التهاب و ضد پرولیفاتو روغن‌های حیاتی به این نتیجه رسیدند که روغن‌های حیاتی (بهارنارنج، لیمون، سرو، اکالیپتوس، رازیانه و آویشن دارای خواص ضد میکروبی، ضد التهاب، دافع حشرات، ضد سرطان و آنتی‌اکسیدانی هستند و رادیکال‌های آزاد را مهار می‌کنند (۳۲). افشارزاده و همکاران در سال ۲۰۱۳ در پژوهش خود تحت عنوان فعالیت‌های ضد میکروبی *In Vitro* به این نتیجه رسیدند که برگ و میوه مخروطیان از جمله عصاره سرو دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر پسودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولی و کاندیدا آلیکانس هستند (۳۳). اسسپوساتو و همکاران در سال ۲۰۱۳ در پژوهش خود تحت عنوان اثر بالینی سرو و ارس به این نتیجه رسیدند که عصاره سرو سبب کاهش علائم تنفسی آلرژیک از جمله رینیت، التهاب ملتحمه و آسم می‌شود (۳۴).

یکی از راه‌های مؤثر و اقتصادی برای کنترل بهتر عوارض ناشی از هایپرگلیسمی، استفاده از آنتی اکسیدانت‌های گیاهی یا سنتتیم است که بی‌خطر بوده و به راحتی توسط سیستم سلولی پذیرفته می‌شوند. مطالعات زیادی نشان‌دهنده‌ی میزان لپید پراکسیداسیون و گلوکاتیون در موش‌های دیابتی دستخوش تغییر می‌شود و تنظیم این مارکرها توسط آنتی اکسیدانت‌های طبیعی مقدور است. در مطالعه‌ای اثر pelargonidin به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانت در درمان درد نوروپاتیک در رت‌های دیابتی شده با استریتوزوسین بررسی شد که pelargonidin باعث کاهش درد در تست فرمالین و صفحه داغ شده و همچنین باعث کاهش لیپید پراکسیداسیون و افزایش سطح آنتی‌های آنتی اکسیدانت در مغز رت‌های دیابتی شد و به این ترتیب pelargonidin با کاهش استرس اکسیداتیو، درد نوروپاتیک را کاهش داد (۲۷).

همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط Yiz و همکارانش انجام شد اثر محافظتی عصاره اتانولی قارچ هریسوم در نوروپاتی رت‌های دیابتی شده با آلکوسان مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش درمان با هریسوم آستانه درد را افزایش داده و کاهش قابل ملاحظه‌ای در گلوکز پلازما و ادرار ایجاد کرد. در این آزمایش، افزایش در لاکتات دهیدروژناز (LDH)، لیپید پراکسیداسیون، کاهش فعالیت گلوکاتیون پراکسیداز و گلوکاتیون ردوکتاز و دیگر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در نتیجه دیابتی شدن ایجاد شده بود که با دریافت قارچ هریسوم ظرفیت آنتی اکسیدانتی تام (TAOS)، به صورت قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه دیابتی کاهش داشت (۲۸).

ابراهیم و همکاران در سال ۲۰۰۹ در پژوهش خود تحت عنوان ترکیبات و فعالیت بیولوژیکی عصاره کلروفورم و سرو به این نتیجه رسیدند که اسانس برگ سرو دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر باسیلوس با حداقل غلظت مهاری ۷۵

حتی در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بهتر از متفورمین عمل کرده است.

مطالعه حاضر در راستای مطالعه آزاد در سال ۲۰۱۴ و علی‌سا در سال ۲۰۱۰ و اصغری و همکاران در سال ۲۰۱۲ بوده که تأیید کننده خواص آنتی‌اکسیدانتی و بهبود فعالیت کبدی و مهار گلوکونئوژنز عصاره سرو است. اگرچه تاکنون مطالعات در خصوص فعالیت ضد دیابتی گیاه سرو بسیار محدود بوده و این مطالعه جز اولین مطالعات در این خصوص، در مدل حیوانی (in vivo) است اما نیاز به بررسی‌های تکمیلی تر بخصوص بررسی فاکتورهای دیگر همچون انسولین سرم و فاکتورهای التهابی و بررسی پاتولوژیک کبدی است.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج حاصل از سنجش مارکرهای آسیب اکسیداتیو نشان‌دهنده‌ی افزایش میزان استرس اکسیداتیو در کبد موش‌های دیابتی بوده که با درمان ترکیبی سرو و متفورمین به مدت ۴ هفته کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت مشاهده شد. در مجموع با توجه به اثرات مناسب سرو در کاهش قند خون و استرس اکسیداتیو در بررسی‌ها و مطالعات بیشتر حیوانی و سپس انسانی می‌توان از این ماده در درمان مکمل کنار سایر داروهای پایین آورنده‌ی قند خون برای کنترل هر چه بهتر عوارض دیابت استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در غالب طرح تحقیقاتی و پایان‌نامه دانشجویی داروسازی با کد اخلاق ۱۵۲۹ بوده و از حمایت‌ها و پشتیبانی‌های مادی و معنوی معاونت تحقیقات و فن‌آوری و مجتمع پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران به دلیل در اختیار قرار دادن آزمایشگاه و اتاق

علی‌سا و همکاران در سال ۲۰۱۰ در پژوهش خود تحت عنوان نقش محافظتی ارس و سرو در برابر تتراکلرید کربن به این نتیجه رسیدند که عصاره ارس و سرو پس از تزریق یک عامل مانند استرس اکسیداتیو مانند تتراکلرید کربن اثر قابل‌توجهی در افزایش عملکرد کبد و کلیه داشته و ممکن است دارای پتانسیل درمانی در سمیت کبد و کلیه باشند (۳۵).

مدت‌ها درخت سرو یک گیاه دارویی در نظر گرفته می‌شده است. برگ‌های خشک‌شده‌ی آن در درد معده و همچنین درمان دیابت، میوه‌های آن در درمان التهاب، درد دندان، لارنژیت و به‌عنوان کنتراستپتو کاربرد داشته است (۳۶). اسانس حاصل از برگ‌ها و میوه‌های این گیاه در درمان سردرد، سرماخوردگی و برونشیت بکار می‌رود. به‌واسطه‌ی اثرات خوب فارماکولوژیک و دارویی این گیاه، سرو به‌طور گسترده در ترکیبات آرایشی، عطرها و صابون بکار می‌رود (۳۷). مقالات متعددی در خصوص ترکیبات اسانس این گیاه (۳۸، ۳۹) و در خصوص فعالیت ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد (۴۰، ۴۱). الفا پینن عمده‌ترین ترکیب در اسانس اندام هوایی این گیاه گزارش شده است (۱۰).

در مطالعه حاضر اثرات عصاره هیدرالکلی این گیاه را در کاهش قند خون و شدت استرس اکسیداتیو در کنار متفورمین داروی متداول مورد استفاده در درمان دیابت بررسی شد. به طوری که تجویز عصاره سرو به موش‌های دیابتی سبب کاهش سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو در کبد موش‌های دیابتی شده و میزان Viability میتوکندریایی کبدی بهبود یافت. اگرچه عصاره سرو باعث کاهش قند خون در سه دوز استفاده گردیده شد اما در وزن موش تأثیر معنی‌داری نداشت. اثر آنتی‌اکسیداتیو استرس عصاره سرو در بافت کبدی قابل مقایسه با متفورمین بوده و

References

1. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53,
2. Agashe S, Petak S. Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes Mellitus. *Methodist Debaque Cardiovasc J* 2018;4:251-6.
3. Van Dam PS. Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18:176-84.
4. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004;25:612-28
5. Teodoro JS, Nunes S, Rolo AP, Reis F, Palmeira CM. Therapeutic options targeting oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation to hinder the progression of vascular complications of diabetes. *Front Physiol* 2019;17:1857-900.
6. Maraschin JF. Classification of diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2012;771:12-9.
7. Melanitou E, Fain P, Eisenbarth G S. Genetics of type 1A (immune mediated) diabetes. *J Autoimmun* 2003;21:93-5.
8. Mandrup-Poulsen T, Pickersgill L, Donath MY. Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 2010;6:158-60.
9. Mehri A, Hasani-Ranjbar S, Larijani B, Abdollahi M, A Systematic review of efficacy and safety of urtica dioica in the treatment of diabetes. *Int J Pharmacol* 2011;7:161-70.
10. Selim SA, Adam ME, Hassan Sh M. Albalawi AR. Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil and methanol extract of the Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:179.
11. American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2010; 33: S62-S69.
12. Lee AJ, Hiscock RJ, Wein P, Walker SP, Permezel M. Gestational diabetes mellitus: clinical predictors and long- term risk of developing type 2 diabetes a retrospective cohort study using survival analysis. *Diabetes Care* 2007; 30:878-85.
13. Metzger B E, Buchanan TA, Coustan DR, De Leiva A, Dunger DB, Hadden DR, et al. Summary and recommendations of the fifth international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007;30:251-5.
14. American Diabetes Association, Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27:88-93.
15. Henzen C. Monogenic diabetes mellitus due to defects in insulin secretion. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13690.
15. Sposato B, Scalese M. Prevalence and real clinical impact of *Cupressus sempervirens* and *Juniperus communis* sensitisations in Tuscan “Maremma”, Italy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2013;41:17-22.
16. Marionj F. Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *Diabetes Care* 2002;25:148-95.
17. Maraschin JF. Classification of diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2012;771:12-19.
18. Yamamoto K, Tsuji Y, Aso Y, Hamasaki T, Shirahata S, Katakura Y. Effect of diazinon exposure on antioxidant reactions in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Appl Entomol* 2011; 135:320-5.

19. Hosseinzadeh H, Sadati N. The Protective Effect of *Allium sativum* L. Clove aqueous and methanolic extracts against hypoxia-induced lethality in mice. *Phytother Res* 2003;17:279-81.
20. Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 945-48
21. Shaki F, Hosseini MJ, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:1940-50.
22. Sadegh C, Schreck RP. The Spectroscopic determination of aqueous sulfite using ellman's reagent. *MURJ* 2003;8:39-43
23. Yamamoto K, Tsuji Y, Aso Y, Hamasaki T, Shirahata S, Katakura Y. Effect of diazinon exposure on antioxidant reactions in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Appl Entomol* 2011;135:320-5.
24. Naito Y, Uchiyama K, Aoi W, Hasegawa G, Nakamura N, Yoshida N. Prevention of diabetic nephropathy by treatment with astaxanthin in diabetic db/db mice. *Bio Factors* 2004;20:49-59.
25. Ardakani A, Mohammadi M. Diabetes, oxidative stress and anti-oxidant. *JSSU* 2009;17:197-214. [In Persian]
26. Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Serum lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in male and female diabetic patients. *Singapore Med J* 2005;46:322-24.
27. Mirshekar M, Roghani M, Khalili M, Tourandokht, Baluchnejadmojarad, Moazzen SA. Chronic oral pelargonidin alleviates streptozotocin-induced diabetic neuropathic hyperalgesia in rat: involvement of oxidative stress. *Iranian Biomed J* 2010;14:33-9.
28. Yi Z, Shao-Long Y, Ai-Hong W, Zhi-Chun S, Ya-Fen Z, Ye-Ting X, et al. Protective effect of ethanol extracts of *hericium erinaceus* on alloxan-induced diabetic neuropathic pain in rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015:595480.
29. Nouri AB, Dhifi W, Bellili S, Ghazghazi H, Aouadhi C, Chérif A, et al. chemical composition, antioxidant potential, and antibacterial activity of essential oil cones of tunisian *cupressus sempervirens*. *J Chem* 2015; 2015:1- 8.
30. Ibrahim NA, El-Seedi HR, Mohammed MM. Phytochemical investigation and hepatoprotective activity of *Cupressus sempervirens* L. leaves growing in Egypt. *Nat Prod Res* 2007;21:857-66.
31. Verma V, Sharma V, Singh V, Kumar R, Khan MF, Singh AK, et al. Labda-8(17),12,14-trien-19-oic acid contained in fruits of *Cupressus sempervirens* suppresses benign prostatic hyperplasia in rat and in vitro human models through inhibition of androgen and STAT-3 signaling. *Phytother Res* 2014;28:1196-203.
32. Aazza S, Lyoussi B, Megías C, Cortés-Giraldo I, Vioque J, Figueiredo AC, et al. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils, *Nat Prod Commun* 2014;9:587-94.
33. Afsharzadeh M, Naderinasab M, Tayarani Najaran Z, Barzin M, Emami SA. In-vitro antimicrobial activities of some iranian conifers. *Iran J Pharm Res* 2013;12:63-74.
34. Russell JW, Zilliox LA. Diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 2005;28:956-62.

35. Ali SA, Rizk MZ, Ibrahim NA, Abdallah MS, Sharara HM, Moustafa MM. Protective role of *Juniperus phoenicea* and *Cupressus sempervirens* against CCl₄ Magda Mohamed Moustafa. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2010;1:123-31.
36. Mascolo N, Autore G, Capasso F, Menghini A, Fasulo MP. Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytother Res* 1987;1:28-31.
37. Usher GA: *Dictionary of plants used by Man*. London: Constable and Company; 1974.
38. Chanegriha N, Baâliouamer A, Meklati BY, Favre-Bonvin J, Alamercery S: Chemical composition of Algerian cypress essential oil. *J Essent Oil Res* 1993;5:671-4.
39. Tapondjou AL, Adler C, Fontem DA, Bouda H, Reichmuthm C. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *J Stored Prod Res* 2005;41:91-102.
40. Mazari K, Bendimerad N, Bekhechi C, Fernandez X. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L. and *Cupressus sempervirens* L. *J Med Plants Res* 2010;4:959-64.
41. Boukhris M, Regane G, Yangui T, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical composition and biological potential of essential oil from Tunisian *Cupressus sempervirens* L. *J Arid Land Stud* 2013;22-1:329-32.