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

Shaki F[1], Habibi E[2], Parandavaji M[3], Ataee R[4]

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

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

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

4. Assistant Professor of Pharmacology, Thalassemia Research Center, Pharmaceutical Sciences Research Center Hemoglubionopathy Instittue, 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 hydroalcohlolic 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.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و چهارم / خرداد و تیر ۱۳۹۸/۶۵-۵۲

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 پران دوجی[۳]، رامین عطایی[۴]

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

۲. استادیار فارماکوگنوزی، 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، انستیو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران (مولف مسئول)، تلفن ثابت: ۳۳۵۴۳۰۸۳-۰۱۱، پست الکترونیک: raminataee1349@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: عصاره گیاه سرو به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی و جاروب‌کننده 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 صفاقیmg/kg ۲۰۰ 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 mg/kg ۱۰۰ و سه گروه که دوزهای mg/kg ۲۰۰ ، 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 گلوتاتیول و میزان پرولیفراسیون میتوکندریایی بررسی شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۱ و آزمون‌های ANOVA و Mann Whitney با $P<۰/۰۱$ و $P<۰/۰۵$ 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 ($P<۰/۰۱$)، اما این اثر در وزن موش معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$) همچنین کاهش پارامترهای اکسیداتیو استرس و بهبود پرولیفراسیون میتوکندریایی کبدی مشاهده شد که قابل مقایسه با متفورمین بود ($P<۰/۰۱$).

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 واژه ها: گیاه سرو زربین، دیابت، استرس اکسیداتیو، استرپتوزوسین، متفورمین

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

مقدمه

دیابت ملیتوس یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامت انسان‌ها است که تخمین زده می‌شود تعداد افراد دیابتی در سال ۲۰۳۰ به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش پیدا کند (۱). عدم کنترل صحیح قند خون در افراد دیابتی منجر به عوارض شدیدی مثل نوروپاتی، رتینوپاتی و نفروپاتی می‌شود. نوروپاتی دیابتی به صورت شرایط مختلفی از درد مانند افزایش حساسیت به درد (hyperalgesia) دیده می‌شود در اکثر عوارض ناشی از بیماری دیابت با نرخ شیوع بیش از ۵۰ درصد گزارش‌شده 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 می‌شود (۴، ۳).

چندین مطالعه پیشنهاد داده است که استرس اکسیداتیو ممکن است یکی از مهم‌ترین مسیرهای ایجاد نوروپاتی دیابتی باشد و استرس اکسیداتیوبه عنوان مسیر نهایی در ایجاد نوروپاتی دیابتی شناخته شده است و تداخلات فارماکولوژیکی که مهار تولید رادیکال‌های آزاد را هدف قرار داده‌اند، اثرات درمانی مفیدی را نشان داده‌اند (۵) و درمان با آنتی اکسیدانت ها می‌تواند 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 می‌شود. عوامل اکسیدانت به عنوان محصولات طبیعی ناشی از متابولیسم هوازی سلولی تولید می‌شوند اما در شرایط پاتوفیزیولوژیک در سطوحی بیشتر از مقدار طبیعی تولید می‌شوند. مولکول‌های اکسیژن می‌توانند به آب احیا شوند. در مراحل میانی این احیا، آنیون های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال های هیدروکسیل تولید می‌شود که با توجه به مراحل احیا، به ترتیب، دارای یک، دو و سه الکترون هستند. همچنین، مولکول‌های اکسیژن سه‌تایی، به‌عنوان دی رادیکال‌ها، در برخورد با الکترون، می‌توانند به مولکول‌های اکسیژن تک تبدیل شوند. رادیکال‌های اکسیژن می‌توانند به صورت رادیکال‌های آلکیل یا پراکسیل، مثلاً در لیپیدها، ایجاد شوند. همچنین نیتریک اکسید می‌تواند به‌عنوان یکی از انواع رادیکال‌های گازی در شرایط بیولوژیک تولید شود. پراکسی نیتریت، گونه غیر رادیکال دوباره فعال شده، از طریق واکنش بین نیتریک اکسید و آنیون های سوپراکسید ایجاد می‌شود.

نیمه عمر رادیکال‌های مختلف اکسیژن با یکدیگر تفاوت زیادی دارند و در نتیجه نیاز به مکانیسم‌های دفاعی متفاوتی برای مقابله با آن‌ها است. بیشترین میزان واکنش‌های انجام‌شده با مولکول‌های هدف در رادیکال‌های هیدروکسیل اتفاق می‌افتد، واکنش‌های مربوط به این رادیکال ها دارای محدودیت انتشار است و این بدان مفهوم است که واکنش‌ها بیشتر در محل تولید رادیکال‌ها اتفاق می‌افتد. برعکس، برخی از رادیکال‌های پراکسیل تقریباً پایدار هستند و نیمه عمری در حد ثانیه دارند. مولکول‌های این‌چنینی می‌توانند از محل تولید خود انتشار یابند و در نتیجه فعالیت‌های اکسیدانتی خود را می‌توانند به سایر محل‌های هدف انتقال دهند (۷، ۶).

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 مدل‌های 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 می‌شود که مشابه کشورهای در حال توسعه این آمار در سال ۲۰۲۵ به ۵۱۱۴۹۰۰ نفر افزایش پیدا کند (۹)، بنابراین با توجه به شیوع

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 زربین با نام علمی (cupres sussempervirens) سرو زربین (cupres sussempervirens)از دسته مخروطیان (pinophyt) رده‌ی ناژویان (pinopsid) راسته‌ی کاجیان (pinales) تیره‌ی سروها (cupressacea) 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 می پردازیم.

روش بررسی

حیوانات

موش‌های سوری با نژاد Albino نر به وزن ۳۰-۲۵ 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 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 - قائم‌شهر) جمع‌آوری گردید و پس از تائید مورداستفاده قرار گرفت. نمونه‌ی هر باریومی این گیاه در دانشکده‌ی بیولوژی دانشگاه آزاد قائم‌شهر نگهداری می‌شود. بخش هوایی گیاه در هوای آزاد و در سایه‌خشک گردید. اندام خشک‌شده با استفاده از دستگاه آسیاب پودر شده تا به ذرات با قطر حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر تبدیل شدند. این پودرها به‌منظور عصاره گیری مورداستفاده قرار گرفت، استرپتوزوسین، تیوباربیتوریک اسید، کیت گلوتاتیون، Tris-Hcl، dimethylthiazol-2-yl]-2,diphenyl (tetrazolium bromide))(MTT از شرکت سیگما (آلمان)، مت فورمین از شرکت راموفارمین (ایران)، مانیتول، ساکارز، ان -بوتانول،) EDTA Hcl ((Ethylenediaminetetraacetic acid) (DMSO,Dimethyl sufoxide) از شرکت MERK (آلمان) و اتانول از شرکت الکل طب اراک تهیه شد.

عصاره گیری 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 عصاره گیری از اتانول استفاده شد. روش انتخابی برای تهیه‌ی اولین عصاره پرکولاسیون بود .در این روش ۱۰۰ گرم از اندام خشک شده‌ی گیاه با ۳۰۰ میلی لیتر

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 پس‌ازاینکه 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 گاواژ به مدت ۳ هفته داده شدد. 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 (به‌صورت محلول در DMSO ۱۰٪) 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 (به‌صورت محلول در DMSO ۱۰٪) 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 در یافت 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 (گلوتایتون، 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 یک‌طرفه 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 مانیتول 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 تیوبابیتوریک اسید اندازه‌گیری می‌شود بدین ترتیب که به ml ۰/۲ از سوسپانسیون بافتی ml ۰/۱ 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 ml ۰/۲ n-بوتانل اضافه و

خوب تکان داده شد سپس در ۶۰۰۰xg به مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ 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 گلوتاتیون

بعد جراحی ۰/۱ گرم از بافت کبد را وزن کرده و به هموژنایزر دستی انتقال داده شد، ۱/۵ میلی‌لیتر EDTA به آن افزوده و خوب هموژن شد، در لوله فالکون به آن ۰/۰۱۰ EDTA و ۱/۵ cc TCA اضافه شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند، سپس به مدت پانزده دقیقه در دور xg ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد و یک میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با pH=۸/۹ (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 nm ۴۱۲ قرائت شد (۲۲).

تست MTT

یک میلی‌لیتر از مخلوط میتوکندری های 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 ۷۰۰۰ g، به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول رویی را دور ریخته وبافر تریس به لوله‌ها اضافه‌شده و دوباره با شرایط قبل سانتریفوژ شد و در پایان به بلورهای بنفش رنگ فورمازان، ۱ میلی‌لیتر DMSO اضافه کرده و با شدت به هم می‌زنیم تا حل شوند. ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول بنفش‌رنگ را به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل کرده و جذب را با پلیت ریدر در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

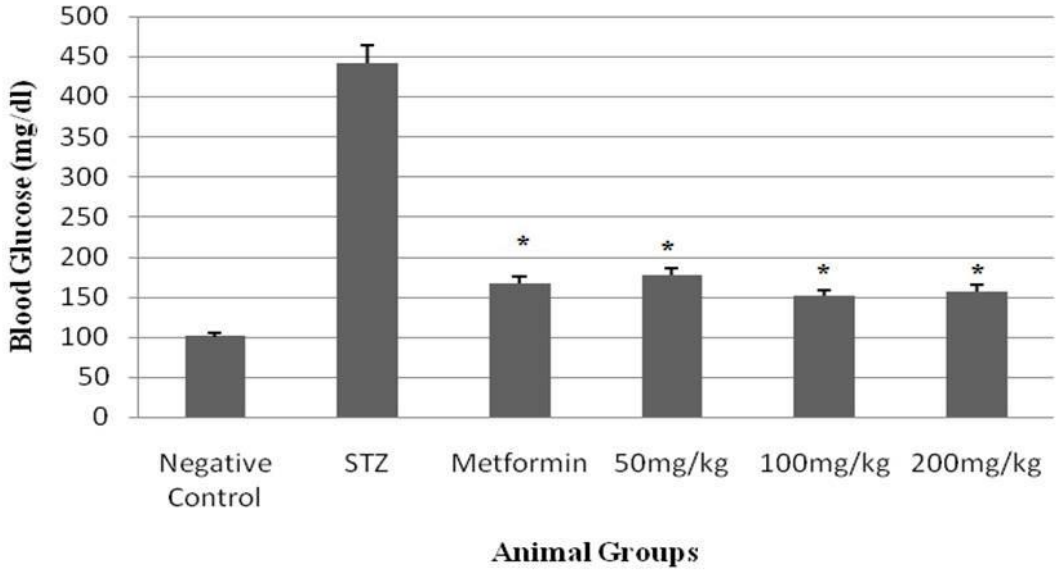
آنالیز آماری

بر اساس مطالعات موجود و از طریق فرمول حجم نمونه محاسبه شد. در نهایت نتایج برحسب میانگین± انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش و همه‌ی 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 صوت عدم نرمال بودن داده‌ها از تست Mann Whitney استفاده گردید. حد معناداری P<۰/۰۵ تعریف شده است.

یافته ها

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

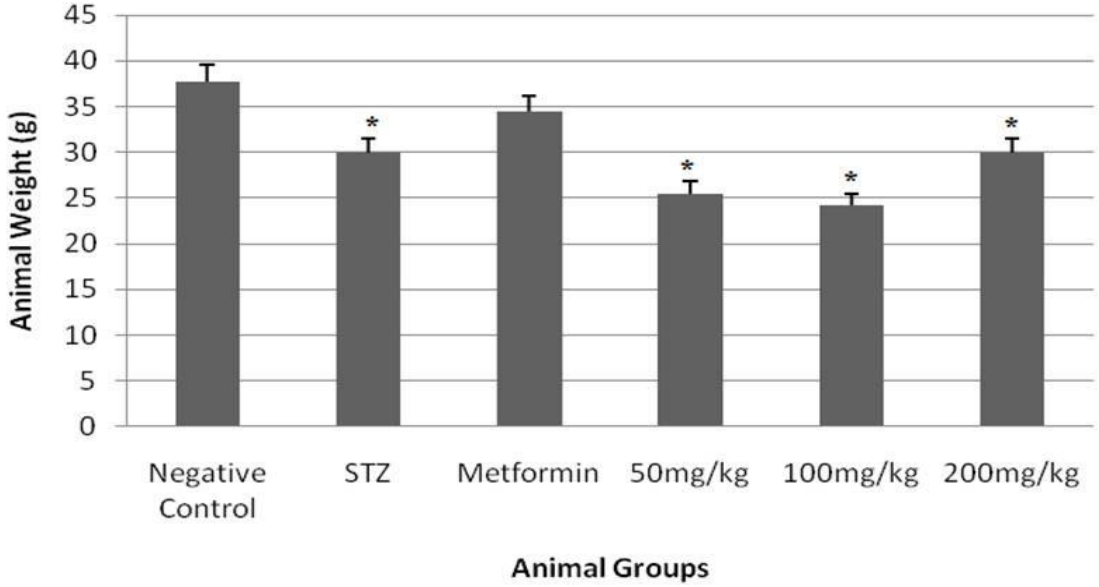
نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که گروه تیمار شده با استرپتوزوسین نسبت به گروه کنترل (نرمال سالین) میزان قند خون بالایی داشته (تفاوت معنی‌دار با P<۰/۰۱) و گروه‌های تیمار شده با عصاره و متفورمین نسبت به گروه دیابتی حاصل از استرپتوزوسین میزان قند خون خیلی پایین داشته که نشان دهنده اختلاف معنی‌داری (P< ۰/۰۵) با گروه استرپتوزوسین است (نمودار ۱).



نمودار۱: میزان قند خون در موش‌های تیمار شده با استرپتوزوسین و عصارهٔ هیدروالکلی

*: تفاوت معنی‌دار با گروه استرپتوزوسین (P<۰/۰۱)

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



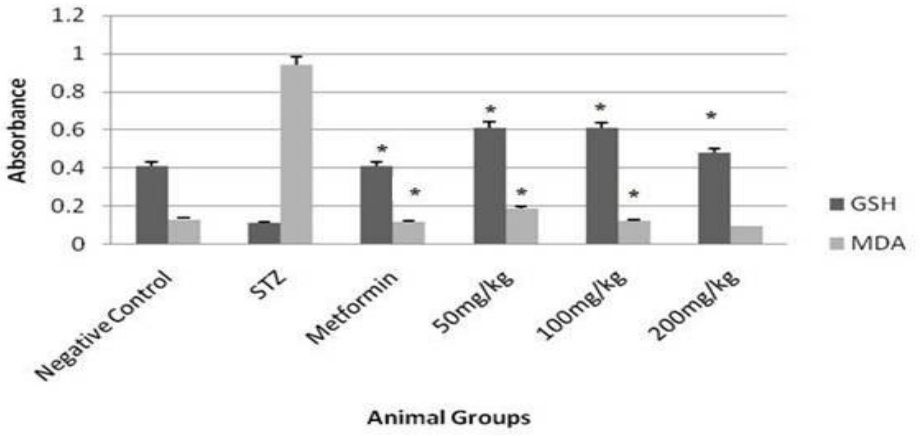
نمودار۲: میزان تغییر وزن در موش‌های تیمار شده با استرپتوزوسین (دیابتی) و عصاره

*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل منفی (P<۰/۰۱)

همان‌طوری که در نمودار ۲ نشان داده می‌شود گروه دریافت‌کننده نرمال سالین نسبت به گروه دریافت کننده استرپتوزوسین دارای وزن بیشتری است P<۰/۰۱ در موش‌های دریافت‌کننده عصاره تغییر وزن معنی‌داری در مقایسه با STZ مشاهده نشد P>۰/۰۵ درحالی‌که متفورمین

نسبت به استرپتوزوسین باعث تغییر معنی‌دار در وزن گردیده است $P<۰/۰۱$.

اثر محافظتی گیاه سرو زربین بر میزان اکسیداتیو استرس در موش‌های نرمال و دیابتی شده:



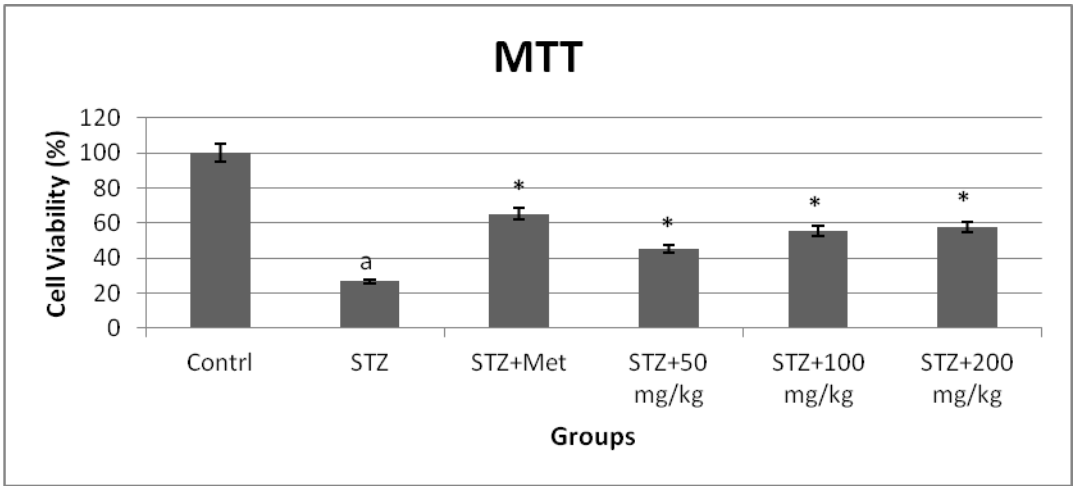
نمودار۳: میزان گلوتاتیون و مالونیل دی آلدئید در بافت کبدی موش‌های تیمار شده با استرپتوزوسین (دیابتی) و عصاره

*: تفاوت معنی‌دار با گروه استرپتوزوسین ($P<۰/۰۱$)

در نمودار ۳ نشان داده می‌شود که میزان گلوتاتیون در گروه‌های دریافت کننده عصاره و متفورمین نسبت به گروه استرپتوزوسین بیشتر بوده که دارای اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۱$)؛ و همچنین میزان مالونیل دی آلدئید در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین نسبت به گروه

نمودار۴- درصد viability میتوکندری کبد در موش‌های تیمار شده با استرپتوزوسین (دیابتی) و عصاره استرپتوزوسین کمتر بوده که اختلاف معنی‌دار است ($P<۰/۰۱$).

بررسی میزان viability میتوکندری سلول‌های کبدی در موش‌های نرمال و دیابتی شده



نمودار ۴: درصد viability میتوکندری سلول‌های کبدی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین با گروه استرپتوزوسین
A: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل (P<۰/۰۱)
*: تفاوت معنی‌دار با گروه استرپتوزوسین (P<۰/۰۱)

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<۰/۰۱) و درصد viability میتوکندری کبدی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره و متفورمین بیشتر از گروه STZ بوده است (P<۰/۰۱).

بحث

دیابت یک بیماری متابولیک بوده که با افزایش اکسیداتیو استرس همراه است و مطالعات مختلف نشان داده‌اند که هایپرگلایسمی 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 آنتی اکسیدانتها می‌تواند در کاهش عوارض دیابت نقش داشته باشد.

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 استرس‌اکسیداتیو 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 پیداکرده 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 (مالونیل دی‌آلدئید) و کاهش گلوتاتیون 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).

یکی از راه‌های مؤثر و اقتصادی برای کنترل بهتر عوارض ناشی از هایپرگلایسمی، استفاده از آنتی اکسیدانت های گیاهی یا سنتتیم است که بی‌خطر بوده و به‌راحتی توسط سیستم سلولی پذیرفته می‌شوند. مطالعات زیادی نشان‌دهنده‌ی میزان لیپید پراکسیداسیون و گلوتاتیون در موش‌های دیابتی دستخوش تغییر می‌شود و تنظیم این مارکرها توسط آنتی‌اکسیدانت های طبیعی مقدور است. در مطالعه‌ای اثر pelargonidin به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانت در درمان درد نوروپاتیک در رت های دیابتی شده با استرپتوزوسین بررسی شد که pelargonidin باعث کاهش درد در تست فرمالین و صفحه داغ شده و همچنین باعث کاهش لیپیدپراکسیداسیون و افزایش سطح آنزیم های آنتی اکسیدانت در مغز رت های دیابتی شد و به‌این‌ترتیب 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 هریسیوم در نوروپاتی رت های دیابتی شده با آلوکسان مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش درمان با هریسیوم آستانه درد را افزایش داده و کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در گلوکز پلاسما و ادرار ایجاد کرد. در این آزمایش، افزایش در لاکتات دهیدروژناز (LDH)، لیپیدپراکسیداسیون، کاهش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز و دیگر فاکتورهای استرس اکسیداتیو در نتیجه دیابتی شدن ایجاد شده بود که با دریافت قارچ هریسیوم 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 کلروفرم و سرو به این نتیجه رسیدند که اسانس برگ سرو دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر باسیلوس با حداقل غلظت مهاری ۷۵ 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 –تریین- ۱۹ – اوییک اسید میوه سرو در سرکوب هیپرپلازی خوش‌خیم 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 تجزیه‌وتحلیل 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 پرولیفراتیو 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 ضدمیکروبی In Vitro به این نتیجه رسیدند که برگ و میوه مخروطیان از جمله عصاره سرو دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر پسودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولی و کاندیدا آلبیکانس 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).

علی سا 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 تتراکلریدکربن 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 داروئی 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 کنتراسپتیو 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 (۳۹،۳۸) و در خصوص فعالیت ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد (۴۱،۴۰). 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 موش های 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 آنتی اکسیداتیو استرس عصاره سرو در بافت کبدی قابل مقایسه با متفورمین بوده و حتی در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بهتر از متفورمین عمل کرده است.

مطالعه حاضر در راستای مطالعه آزا در سال ۲۰۱۴ و علی سا در سال ۲۰۱۰ و اصغری و همکاران در سال ۲۰۱۲ بوده که تائید کننده خواص آنتی اکسیدانتی 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 تکمیلی‌تر 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. درمجموع 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

تشریح و جناب آقای دکتر سروی مدیریت مجتمع حیوانات تقدیر و تشکر می‌گردد.

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 Debakey 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 silkmoth, 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-inducedlethality 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 silkmoth, 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 phoeniceaand Cupressus, sempervirensagainst 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.