

اثر ضد دیابتی مخلوط عصاره گیاهان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل در مدل حیوانی موش صحرایی دیابتی و ارزیابی عوارض احتمالی کبدی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۴/۰۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیک با علل وابسته به کمبود یا اختلال عملکرد انسولین است. هدف این پژوهش بررسی اثر ضد دیابتی مخلوط عصاره گیاهان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل در مدل حیوانی موش صحرایی دیابتی و ارزیابی عوارض احتمالی کبدی ناشی از این عصاره است. **روش کار:** در این مطالعه تجربی تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با تجویز آلوکسان 60 mg/kg به صورت داخل صفاقی دیابتی شدند. بعد از یک هفته، موش‌های دیابتی به طور تصادفی به پنج گروه شش تایی تقسیم شدند. گروه کنترل منفی تحت گاوآژ با آب مقطر، گروه کنترل مثبت تحت گاوآژ با متفورمین 100 mg/kg و سه گروه دیگر تحت گاوآژ با مخلوط عصاره گیاهی ($600, 300, 150\text{ mg/kg}$) در هر روز قرار گرفتند. بعد از دوره تیمار (۳۰ روز) نمونه خون از دم هر موش صحرایی برای بررسی FBS فول و قند دو ساعته (2hpp) و بیومارکهای کبدی گرفته شد. در مرحله بعد موش‌ها با کتامین و زایلازین بیهوش و بافت کبد با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُئوزین توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی هیستوپاتولوژی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد عصاره در دوزهای 600 mg/kg و 300 mg/kg سطح FBS و 2hpp را به طور معناداری کاهش داد. همچنین عصاره در دوز 600 mg/kg موجب افزایش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی شد و به نسج کبد آسیب وارد کرد.

نتیجه گیری: مخلوط عصاره گیاهی در دوز 300 mg/kg دارای اثر ضد دیابتی بوده و اثرات سمی روی کبد ندارد.

کلید واژه‌ها: دیابت شیرین، داروهای ضد دیابت، داروهای گیاهی، بیماری‌های کبد، موش صحرایی ویستار

بهاره توکلی فر^{۱,۲}

آسیه حسینی^۳

حسن فلاح حسینی^۴

مهدی محمدی^۵

مهدی گورزوند^{۶,۷}

۱. دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات پروبیوتیک و مکمل‌های غذایی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۲. گروه فیزیولوژی-فارماکولوژی-فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۳. دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۴. دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران
۵. دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۶. دانشیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

* نویسنده مسئول:

کرج، بلسوار موزن، انتهای خیابان بوعلی غربی، پردیس دانشگاه علوم پزشکی البرز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی-فارماکولوژی-فیزیک پزشکی

کد پستی: ۳۱۴۹۹۶۹۴۱۵

تلفن همراه: ۰۹۱۲۵۶۴۴۶۲۰

تلفن: ۰۲۶۳۴۱۹۸۳۰۲

ایمیل: m.godarzvand@abzums.ac.ir

Orcid Code: 0000-0002-4229-5148

مقدمه

دیابت شیرین، یک بیماری متابولیک با تظاهرات هیپرگلیسمی است که یک معضل بسیار مهم و در حال رشد در سراسر جهان به شمار می‌رود. سازمان بهداشت جهانی تخمین می‌زند که صدها میلیون نفر در سراسر جهان از دیابت رنج می‌برند. بدون اقدام فوری، احتمالاً تعداد مبتلایان تا سال ۲۰۳۰ دو برابر می‌شود.^۱ به طور کلی، دیابت به دو نوع اصلی طبقه‌بندی می‌شود؛ دیابت نوع ۱ که حالت کمبود انسولین به دلیل نقص در عملکرد یا تخریب سلول‌های β است و دیابت نوع ۲ که عمدتاً به دنبال مقاومت در برابر اعمال انسولین ایجاد می‌شود.^۲ با گذشت زمان، دیابت منجر به عوارض جدی میکروواسکولار و ماکروواسکولار مانند نوروپاتی، رتینوپاتی، نوروپاتی و بیماری‌های قلبی عروقی می‌شود. اگرچه تظاهرات زودرس دیابت را می‌توان با داروهای خوراکی کاهنده قند خون یا درمان با انسولین کنترل کرد و از بروز پیامدهای ناگوار آن کاست، اما عوارض دیررس جدی که در بسیاری از بیماران ظاهر می‌شود معمولاً برگشت ناپذیر و بعضاً بالقوه کشنده هستند.^۳ مانند بسیاری از بیماری‌های مزمن درمان قطعی برای دیابت وجود ندارد. درمان‌های رایج شامل تغییر شیوه زندگی، داروهای خوراکی و تزریقی می‌باشند.

گیاهان همیشه منبع خوبی برای یافتن عوامل درمانی جدید برای بیماری‌های انسانی بوده‌اند. با توجه به دسترسی راحت‌تر به منابع گیاهی (با توجه به بومی بودن گیاهان در کشور ایران)، عوارض کمتر گیاه درمانی، مقبولیت بیشتر برای اکثر بیماران، عدم محدودیت تولید یا واردات مواد اولیه دارویی، استفاده از گیاهان برای درمان دیابت منطقی به نظر می‌رسد.^۴ در پروژه حاضر اثربخشی گیاهان دارویی با خواص کاهندگی گلوکز خون مورد بررسی قرار گرفت. گیاهانی برای انجام پروژه انتخاب شدند که اولاً، در طب سنتی ایران در درمان بیماری دیابت تجویز می‌شده‌اند و ثانیاً، گزارش‌های بالینی و آزمایشگاهی معتبری مبنی بر موثر بودن آن‌ها موجود است. بر این اساس ما در این مطالعه از گیاهان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل استفاده نمودیم.

شنبلیله: مطالعات تاریخ طب نشان می‌دهد شنبلیله که با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* شناخته می‌شود به طور شایعی به عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده قرار گرفته است.^۵ در یک مطالعه حیوانی، عصاره خشک بذر شنبلیله توانسته گلوکز خون را در موش‌های سوری دیابتی پایین بیاورد.^۶ همچنین فراکسیون غنی از فیبر عصاره شنبلیله

باعث کاهش گلوکز و کلسترول خون در سگ‌های دیابتی شده با آلوکسان شده است.^۷

قره قاط: میوه و برگ *Vaccinium arctostaphylos* یا قره قاط در طب سنتی برای درمان دیابت و فشار خون بالا به کار می‌روند. مشاهده شده است که مصرف خوراکی روزانه عصاره آبی برگ قره قاط (بدون استفاده همزمان داروهای صنعتی خوراکی ضد دیابت) سطوح گلوکز خون ناشتای بیماران مبتلا به دیابت خفیف نوع دوم را تا سطح طبیعی کاهش داده و فاقد عوارض نامطلوب بوده است.^۸

خار مریم: خار مریم که با نام علمی *Silibum marianum* شناخته می‌شود گیاه بومی ایران است. مهم‌ترین ترکیب این گیاه سیلی مارین است. تحقیقات نشان داده است که عصاره بذر این گیاه در کاهش قند خون موثر است.^{۹-۱۱} همچنین استفاده از عصاره بذر گیاه سیلیمارین روی بیماران دیابتی موجب کاهش سطح گلوکز خون ناشتا، کاهش هموگلوبین گلیکوزیله شده است.^{۱۲}

گزنه: گزنه با نام علمی *dioica urtica* دارای ترکیبات فالونوئیدهای گوناگون، انواع ویتامین‌ها و ترکیبی به نام گلوکوکینین است که اثرات ضد دیابتی گلوکوکینین پیشتر به اثبات رسیده است.^{۱۳}

بادرنجبویه: بادرنجبویه *Melissa officinalis* فلور ایران است. مطالعات نشان داده‌اند که تجویز عصاره این گیاه به موش‌های مبتلا به دیابت نوع دو میزان گلوکز سرم را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد و همچنین باعث بهبود تحمل گلوکز شده و سطح انسولین سرم را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد.^{۱۴، ۱۵}

هندوانه ابوجهل: *Citrulluscolocynthis* موجب کاهش سطح گلوکز و لیپیدهای خون می‌شود.^{۱۶، ۱۷}

همانطور که اشاره شد گیاهانی که برای پروژه حاضر انتخاب شدند هریک به تنهایی اثرات ضد دیابتی قابل قبولی را از خود نشان داده‌اند. اما آن چه تا کنون نامعلوم مانده است اثر تجمعی این مجموعه گیاهان دارویی سنتی ایرانی است. وجود این مسئله مهم در تحقیقات گیاهان سنتی ایرانی، موجب شد تا ترکیبی از عصاره‌های خارمریم، بادرنجبویه، قره قاط، شنبلیله، گزنه و هندوانه ابوجهل برای انجام پروژه انتخاب شود. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات ضد دیابتی مخلوط عصاره گیاهان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل و تعیین سمیت این عصاره روی کبد در مدل حیوانی موش صحرایی دیابتی می‌باشد.

روش کار

تهیه عصاره گیاهان

در این مرحله ابتدا بذر گیاهان شنبلیله، خارمریم، گزنه و برگ گیاهان قره قاط، بادرنجبویه و میوه هندوانه ابوجهل خریداری شد. سپس گونه گیاهان توسط کارشناس گیاهشناسی پژوهشکده گیاهان دارویی تایید و کد هر باریمی از آنها تهیه شد و در کیسه پلی اتیلن تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند. سپس گیاهان تهیه شده تحت دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند تا خشک شوند. سپس گیاهان خشک شده آسیاب شده و تبدیل به پودر شدند. پودر حاصل با اتانول ۹۵٪ ترکیب شده و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر و در دمای ۸۵- درجه سانتیگراد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت مخلوط حاصل از فریزر خارج شده و جهت خالص سازی با استفاده از پمپ خلا و کیف بوختر، از کاغذ صافی عبور داده شده و وارد فلاسک و کیوم شد. مایع صاف شده حاصل حاوی اتانول و عصاره گیاه است.^{۱۸} در مرحله بعدی اتانول از محلول جدا شده و فقط پودر عصاره باقی ماند. این عمل جداسازی توسط دستگاه Dryer-Spray انجام شد.^{۱۹} پودر عصاره الکلی مورد استفاده در این تحقیق در پژوهشکده گیاهان دارویی کرج تهیه شد.

کد هر باریم گیاهان مورد استفاده

- بخش های هوایی گیاه *M. officinalis*، تهیه شده از اراک ۱۴۹۴ ((IMPH
- برگ و میوه *V. arctostaphylos* تهیه شده از گیلان (IMPH) ۱۴۳۹
- دانه *T. foenum-graecum* تهیه شده از فروشگاه های شهر تهران
- بخش هوایی گیاه *U. dioica* تهیه شده از قزوین (IMPH) (۷۴۴)
- گیاه *C. colocynthis* تهیه شده از فروشگاه های شهر یزد
- دانه گیاه *S. Marianum* (تهیه شده از فروشگاه های شهر تهران)

آماده سازی مخلوط عصاره

با توجه به مطالعاتی که در زمینه دوز بهینه مصرفی این گیاهان انجام شده است، مخلوط خشک عصاره گیاهی حاوی ۲۲٪ شنبلیله، ۵/۱۶٪ قره قاط، ۲/۱۳٪ خارمریم، ۸/۸٪ بادرنجبویه، ۳۳٪ گزنه و ۵/۶٪ هندوانه ابوجهل می باشد^{۲۰-۲۲}. از اتانول ۹۵٪ به عنوان حلال عصاره گیاهی در این مطالعه استفاده شد. با استفاده از مخلوط عصاره خشک و حلال ذکر شده،

غلظت های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر از مخلوط عصاره گیاهی تولید شد و برای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

حیوانات آزمایشگاهی

تعداد ۳۰ سر موش صحرایی از نژاد Sprague Dawley، با سن ۶ هفته و وزن 150 ± 15 گرم از انستیتو پاستور خریداری شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه یک هفته به منظور سازش با محیط، شرایطی فراهم شد که حیوانات به آب و غذای معمولی بدون محدودیت دسترسی داشتند. دمای اتاق حیوانات طی مطالعه در ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شد. همچنین رطوبت نسبی محیط ۴۰٪ و چرخه تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعت در نظر گرفته شد. تمام مراحل آزمون براساس دستورالعمل کمیته اخلاق در پژوهش های دانشگاه علوم پزشکی البرز (کد اخلاق: IR.ABZUMS. ۱۴۰۰، ۰۰۱) انجام شد.

القای دیابت و گروه بندی حیوانات

تعداد ۳۰ سر موش صحرایی پس از ۱ شب ناشتایی با تجویز آلوکسان با دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم با سرنگ انسولین به صورت داخل صفاقی دیابتی شدند. بعد از یک هفته نیاز به تایید دیابت موش ها برای ورود به مطالعه می باشد. به منظور تایید دیابتی شدن موش ها، بعد از یک هفته قند تصادفی در ۲ نوبت از هر موش به کمک گلوکومتر اندازه گیری شد. وجود ۲ نوبت قند تصادفی بالای ۲۰۰ mg/dl معیار ورود موش های صحرایی به مطالعه بود. سپس موش های صحرایی دیابتی به طور تصادفی به ۵ گروه هر گروه شامل ۶ رت تقسیم شدند: گروه ۱ (کنترل منفی): با آب مقطر با حجم ثابت ۵ میلی لیتر در کیلوگرم در روز گاوژ گردید. گروه ۲ (کنترل مثبت): متفورمین با حجم ثابت ۵ میلی لیتر با دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز گاوژ گردید. گروه ۳ (گروه تیمار): مخلوط عصاره خوراکی با حجم ثابت ۵ میلی لیتر با دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز گاوژ گردید. گروه ۴ (گروه تیمار): مخلوط عصاره خوراکی با حجم ثابت ۵ میلی لیتر با دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز گاوژ گردید. گروه ۵ (گروه تیمار): مخلوط عصاره خوراکی با حجم ثابت ۵ میلی لیتر با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز گاوژ گردید.

نمونه گیری

موش ها از نظر وضعیت ظاهری، زنده مانگی و تغییرات رفتاری روزانه یک مرتبه مورد بررسی قرار گرفتند. در شب ۲۹ آزمایش موش های صحرایی یک

آنالیز آماری داده‌ها

پس از تایید توزیع نرمال بودن داده‌ها، داده‌ها با آزمون One way ANOVA و تست تعقیبی Post-hoc Tukey تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند. این داده‌ها در نرم افزار SPSS ۲۲ تحلیل شدند. در این پژوهش P value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

یافته‌ها

بررسی اثرات ضد دیابتی مخلوط عصاره گیاهی

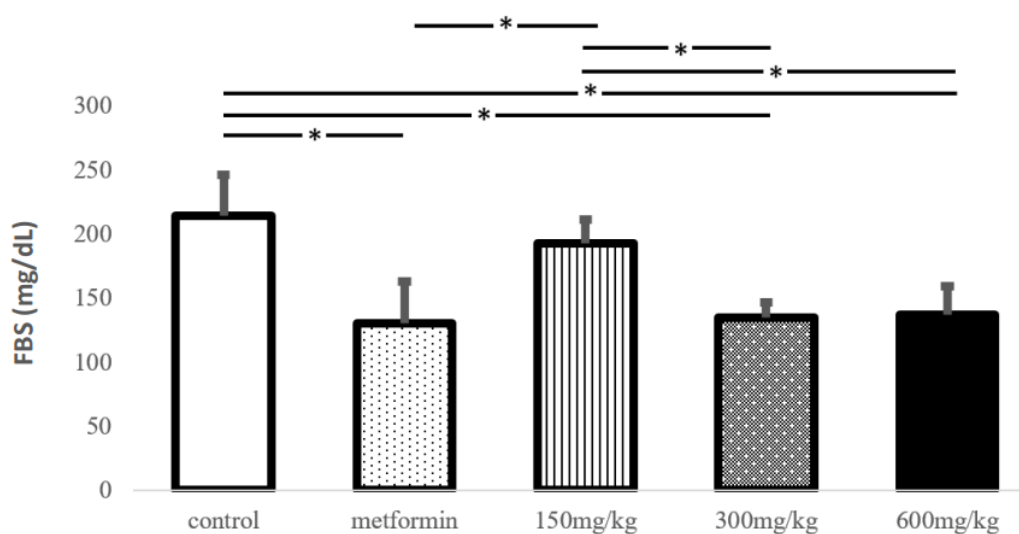
همانطور که در نمودارهای ۱ و ۲ ملاحظه می شود قند تصادفی موش‌های دیابتی شده با نالوکسان در ۲ نوبت پس از ۷ روز و همچنین قند خون ناشتای موش‌ها پس از ۳۰ روز در تمامی گروه‌ها به میزان معناداری افزایش داشته است که نشان دهنده اثرات دیابت زایی آلوکسان می‌باشد. ($p\text{-value} = 0.048$) گروه کنترل مثبت در این مطالعه تحت درمان با متفورمین با دوز 100 mg/kg روزانه قرار گرفت. همانطور که در نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد متفورمین به طور معنی‌داری هم سطح FBS و هم سطح قند 2hpp را نسبت به گروهی که تنها آلوکسان دریافت کرده اند کاهش می‌دهد ($p\text{-value} = 0.029$, $p\text{-value} = 0.031$). گروه‌های تیمار در این مطالعه تحت درمان با مخلوط عصاره گیاهان با دوزهای 150 , 300 , 600 mg/kg به مدت ۳۰ روز قرار گرفتند. نتایج این مطالعه در زمینه اثرات ضد دیابتی مخلوط عصاره‌ها، نشان می‌دهد که کاهش قند خون ناشتا در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل در دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش معناداری داشته‌اند. همچنین می‌توان در نمودار ۱ این اثرات را مشاهده نمود (به ترتیب $p\text{-value} = 0.012$ و $p\text{-value} = 0.026$) به طور مشابه نمودار ۲ نشان می‌دهد 2hpp به طور معنی‌داری در دوزهای ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کمتر از گروه کنترل می‌باشد) به ترتیب $p\text{-value} = 0.011$ و $p\text{-value} = 0.031$) در انتها قابل ذکر می‌باشد که مقایسه گروه‌های تیمار در دوز ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم با گروه تحت درمان با متفورمین با دوز ۱۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم تغییر معناداری را نشان نداده است.

شب ناشتا شده و صبح روز ۳۰ام ابتدا به منظور بررسی FBS و بیومارکرهای کبدی و کلیوی، نمونه خون از دم هر موش صحرایی گرفته شد و سپس به موش‌های صحرایی به میزان 2 g/kg گلوکز گاوژ شده و ۲ ساعت بعد (2hpp) مجدداً نمونه‌گیری انجام گردید و نمونه‌ها در محیط آزمایشگاه قرار داده شد تا منعقد گردند^{۲۳}. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ده دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم‌ها جدا گردیدند و جهت اندازه‌گیری سطح خونی گلوکز، سطح (2hpp) Post Prandial Glucose، Creatinin، SGOT، SGPT، BUN به آزمایشگاه ارسال شدند.

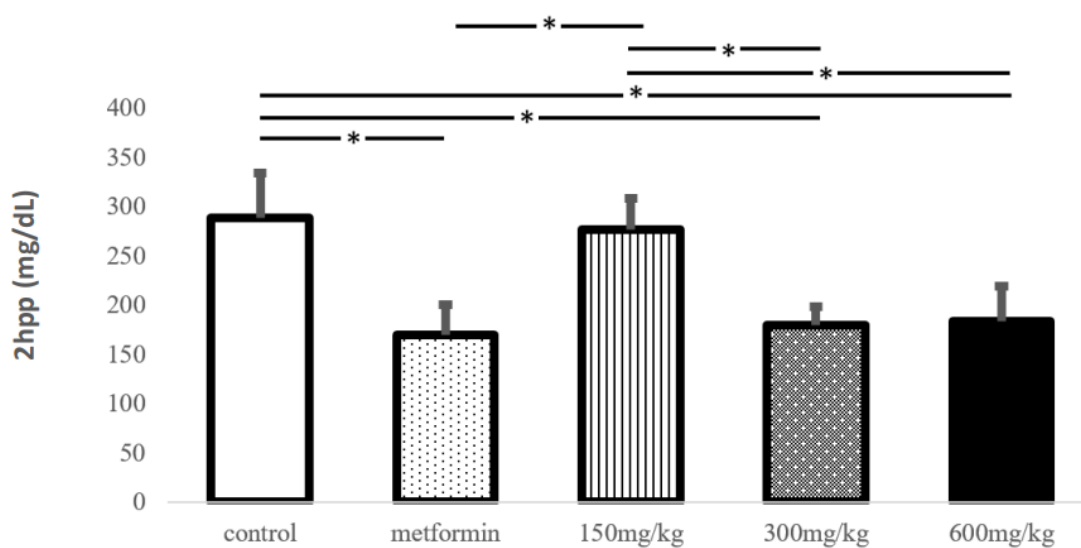
در مرحله آخر حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین و زایلازین به صورت کامل بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل، حیوان به پشت روی کاغذ جاذب یکبار مصرف قرار داده شد، پوست و عضلات شکم با استفاده از فورسپس برداشته شد و با دقت از غضروف زیفوئید در امتداد هر دو پهلو برش انجام گردید. این برش تا جلوی دهانه لگن ادامه یافت^{۲۴}. در همه گروه‌ها موش‌های صحرایی مورد کالبد شکافی قرار گرفتند. تغییرات ظاهری در بافت‌ها و اندام‌های شکمی ثبت و اندام‌ها و بافت‌های منتخب برای بافت شناسی برداشت شدند. بعد از کالبد شکافی معاینه اولیه شامل بررسی کلیه سطوح و حفره‌های خارجی و همچنین حفره‌های قفسه سینه، سینه و شکم و محتویات آنها انجام شد. سپس اندام‌های کلیه، و کبد جدا شده و در فرمالین ۱۰٪ نگهداری و جهت تهیه لام از بافت و بررسی تغییرات بافتی به آزمایشگاه ارسال شدند.

بررسی بافتی

در این مرحله بافت‌ها ابتدا با الکل آب‌گیری شدند و پس از آن به وسیله گزیلن باقیمانده الکل از بافت‌ها خارج شد و توسط دستگاه آماده‌ساز بافت، بلوک پارافینی از آنها تهیه گردید. سپس با میکروتوم از بلوک‌ها برش با ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه و به روش همتاکسیلین-انوزین (E&H) رنگ آمیزی شدند و به کمک میکروسکوپ نوری بررسی هیستوپاتولوژی انجام شد.



نمودار ۱- تاثیر مخلوط عصاره گیاهی در سه دوز متفاوت بر سطح قند خون ناشتا موش های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه های تیمار و مقایسه با گروه های کنترل مثبت و منفی (*p-value < 0.05). داده ها به صورت Mean $\pm$ SD ارائه شده است.



نمودار ۲- تاثیر مخلوط عصاره گیاهی در سه دوز متفاوت بر سطح قند خون ۲hpp موش های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه های تیمار و مقایسه با گروه های کنترل مثبت و منفی (*p-value < 0.05). داده ها به صورت Mean $\pm$ SD ارائه شده است.

بررسی اثرات مخلوط عصاره گیاهی بر بیومارکرهای کلیوی و کبدی

در بررسی بیومارکرهای کبدی، سطح AST و ALT در گروه ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرمی بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل که هیچ درمانی دریافت نکرده است تغییر معناداری نداشته اند.

همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است در بررسی بیومارکرهای کلیوی، سطح سرمی Cr, BUN در گروه های تیمار در تمامی دوز ها تغییر معنی داری نسبت به گروه کنترل که هیچ درمانی دریافت نکرده، نداشته است.

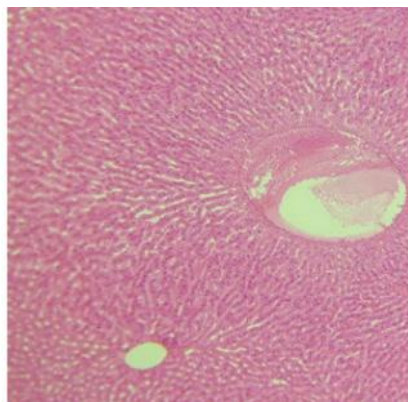
جدول ۱- نتایج بیومارکرها یا آزمایشات کبدی در گروه های مورد مورد مطالعه (داده ها به صورت Mean $\pm$ SD ارایه شده است).

معیار (Reference)	104.50 $\pm$ 43.03	کنترل	AST
0.964	117.50 $\pm$ 42.45	۱۵۰ میلی گرمی بر کیلوگرم	
0.196	160.05 $\pm$ 49.99	۳۰۰ میلی گرمی بر کیلوگرم	
0.001**	275.18 $\pm$ 93.94	۶۰۰ میلی گرمی بر کیلوگرم	
معیار (Reference)	48.36 $\pm$ 12.01	کنترل	ALT
0.999	48.92 $\pm$ 14.90	۱۵۰ میلی گرمی بر کیلوگرم	
0.899	52.30 $\pm$ 13.21	۳۰۰ میلی گرمی بر کیلوگرم	
0.001**	73.02 $\pm$ 10.10	۶۰۰ میلی گرمی بر کیلوگرم	
(**p-value < 0.01)			

نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژی کبدی

دیده شدند. تنها در گروه دریافت کننده عصاره با دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم تغییرات آسیب شناسی کبد شامل نکروز هپاتوسیت ها، انفیلتراسیون سلول های التهابی و نکروز هموراژیک گزارش شد.

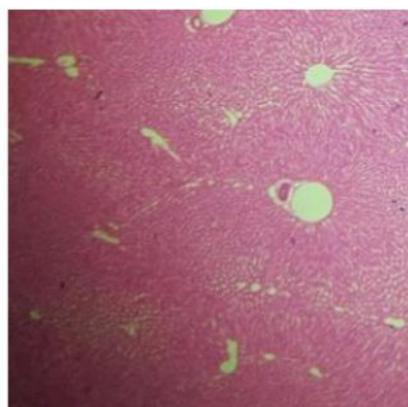
A



۴۰x

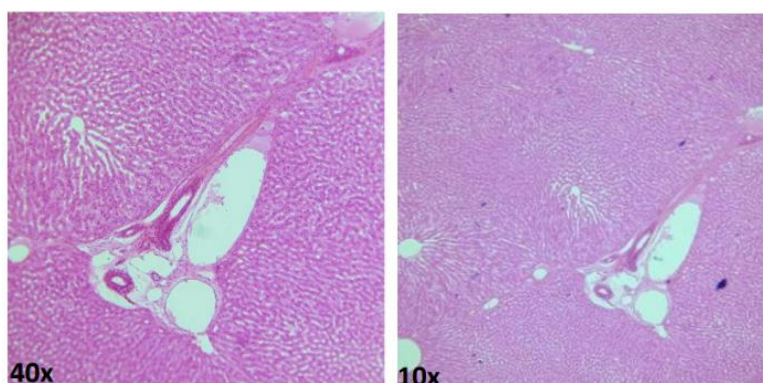
نتایج پاتولوژی بافت های کبدی نشان داد که در دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم طی ۳۰ روز تغییرات تخریبی بافتی اعم از نکروز و انفیلتراسیون سلول های التهابی دیده نشد و هپاتوسیت ها با نظم طبیعی

B



۱۰x

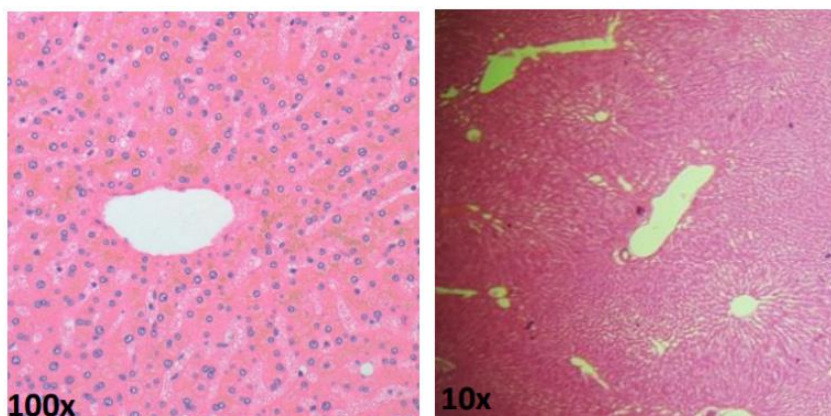
شکل ۱ A: نمای طبیعی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه کنترل بدون دریافت مخلوط عصاره گیاهی. (۱۰X) شکل B: نمای طبیعی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه کنترل بدون دریافت مخلوط عصاره گیاهی. (۴۰X)



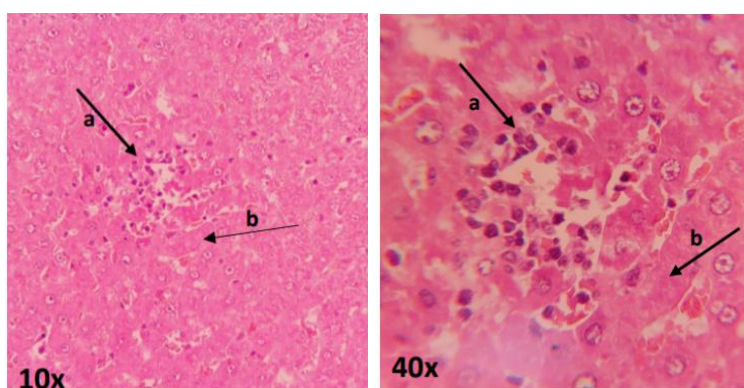
شکل ۲: A: نمای طبیعی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه دریافت کننده مخلوط عصاره گیاهی با دوز ۱۵۰ mg/kg (۱۰X).
B: نمای طبیعی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه دریافت کننده مخلوط عصاره گیاهی با دوز ۱۵۰ mg/kg (۴۰X).

A

B



شکل ۳: A: نمای طبیعی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه دریافت کننده مخلوط عصاره گیاهی با دوز ۳۰۰ mg/kg (۱۰X).
B: نمای طبیعی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه دریافت کننده مخلوط عصاره گیاهی با دوز ۳۰۰ mg/kg (۱۰۰X).



شکل ۴: نمای التهابی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه دریافت کننده مخلوط عصاره گیاهی با دوز ۶۰۰ mg/kg (۱۰X), (۴۰X).
a: انفیلتراسیون لنفوسیت ها در بافت کبدی. b: نکروز هپاتوسیت (سلول بدون هسته) در کنار تجمع لنفوسیتی.

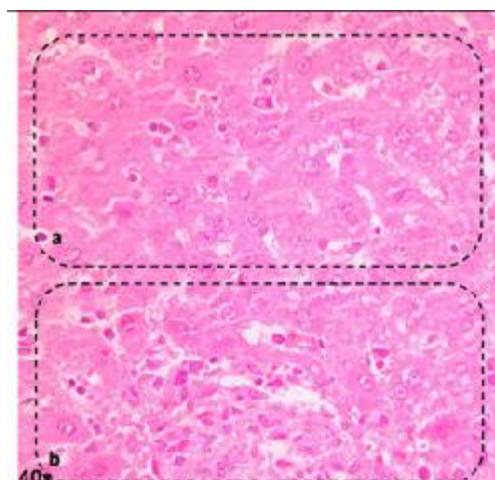
ما نیز با شیب زیادی در حال پیشرفت است. این بیماری دامنه عوارض و اثرات گسترده‌ای دارد که کیفیت زندگی و امید به زندگی مبتلایان را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

گیاهان همیشه منبع خوبی برای یافتن عوامل درمانی جدید برای بیماری‌های انسانی بوده‌اند. با توجه به دسترسی راحت‌تر به منابع گیاهی، عوارض کمتر گیاه درمانی، مقبولیت بیشتر برای اکثر بیماران، عدم محدودیت تولید یا واردات مواد اولیه دارویی و هم چنین اثبات تاثیر قطعی تک تک گیاهان مورد استفاده در این مطالعه بر روی دیابت، تحقیق جهت دستیابی به منبع دارویی گیاهی به صورت مخلوط گیاهی موثر ضروری به نظر می‌رسد.^۴

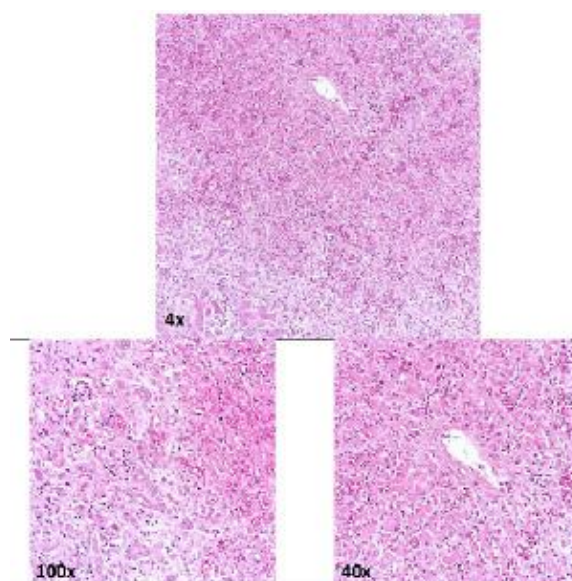
آن چه مطالعه حاضر به وضوح نشان می‌دهد مخلوط عصاره‌های گیاهان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجوبیه و هندوانه ابوجهل در دوز ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دارای اثرات ضد دیابتی می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد استفاده از دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تاثیر معنی داری بر سطح اندکس‌های مرتبط با دیابت ندارد. طیف وسیعی از اجزای فعال مشتق شده از گیاهان دارویی مانند آلکالوئیدها، فلوئوئیدها، پلی فنول، کینون‌ها و ترپنوئیدها ممکن است به عنوان منابع جایگزین عوامل ضد دیابت عمل کنند. آنها معمولاً موجب بهبود عملکرد پانکراس از طریق افزایش ترشح انسولین یا کاهش جذب روده ای گلوکز می شوند. سهولت استفاده، در دسترس بودن، هزینه کم و کمترین عوارض جانبی نامطلوب، فرآورده‌های گیاهی را به بازیگر کلیدی در عرصه درمان بیشتر بیماری‌ها تبدیل کرده است.^{۲۵}

مطالعه حاضر اولین مطالعه ای نیست که اثرات گیاهان را در مدیریت دیابت نشان می‌دهد. در یک مطالعه با بررسی اثرات مولکولی و متابولیک ضد دیابتی عصاره شنبلیله در موش صحرایی، به قابلیت اثر آن در پایین آوردن میزان قند خون که حتی با انسولین قابل مقایسه است پی بردند. همچنین در این مطالعه با به کار بردن مکمل واندایوم (از مکمل‌های واندایوم به علت اثرات کاهنده قند خون آن در افراد دیابتی استفاده می‌شود) متوجه شدند که مصرف عصاره و حتی پودر شنبلیله در کنار این مکمل، در اثرات کاهندگی قند خون هم افزایی دیده می‌شود و از طرفی شنبلیله به صورت معنی‌داری اثرات سمی مکمل واندایوم را کاهش می‌دهد.^{۲۶}

در مطالعه منور فشانی و همکاران اثرات ضد دیابتی گیاه قره قاط که پیش از این در طب سنتی ایران به عنوان داروی دیابت استفاده می‌شده



شکل ۵. نمای التهابی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه دریافت کننده مخلوط عصاره گیاهی با دوز ۶۰۰ mg/kg (a). در ناحیه مشخص شده نکروز هپاتوسیت‌ها دیده می‌شود. b: در ناحیه مشخص شده انفیلتراسیون سلول‌های التهابی در مجاورت نکروز دیده می‌شود.



شکل ۶. نمای التهابی هیستوپاتولوژی بافت کبد در موش صحرایی دیابتی شده با آلوکسان در گروه دریافت کننده مخلوط عصاره گیاهی با دوز ۶۰۰ mg/kg نشان دهنده تغییرات نکروتیک و انفیلتراسیون لنفوسیتی گسترده می باشد (۱۰۰x, ۴۰x, ۱۰x).

بحث

دیابت یکی از بیماری‌های متابولیک شایع در سطح جهان است. این بیماری با توجه به تغییر عادات غذایی و سبک زندگی مردم، به طور روز افزونی افراد بیشتری را درگیر می‌کند. میزان ابتلا به این بیماری در کشور

است، مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش مشخص شد که میوه قره قاط یک عامل ضد دیابتی قوی، جلوگیری از افزایش قند خون، آنتی اکسیدان و کاهنده تری گلیسرید است.^{۲۷}

در مطالعات مشابه اثرات قوی کاهنده قند خون و پیش گیرنده افزایش قند خون ناشی از عصاره آبی خارمریم و زبان گنجشک در موش‌های صحرایی دیابتی نوع ۱ ناشی از مصرف استرپتوزوسین، به اثبات رسید. همچنین دیده شد مصرف این مکمل تأثیری بر غلظت انسولین پایه پلاسما خون نداشته است.^{۲۸}

در مطالعه تجربی دیگر، با بررسی اثر روغن بادرنجبویه بر موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ پی بردند که مصرف روغن این گیاه در غلظت های کم خواص کاهنده قند خون موثری دارد. این خواص به افزایش توانایی جذب گلوکز و متابولیسم آن در سلول‌های کبد و بافت چربی و همچنین مهار گلوکونئوز در کبد نسبت داده شده است.^{۲۹}

مطالعات علمی انجام شده مسیر های فارماکولوژیک ضد دیابتی میوه هندوانه ابوجهل را مورد بررسی قرار داده‌اند. این گیاه موجب کاهش سطح گلوکز و لیپیدهای خون، محافظت و بازسازی سلول‌های لوزالمعده و افزایش ترشح انسولین از آن‌ها می‌شود.^{۱۷،۱۶} اثر ضد دیابتی عصاره میوه این گیاه در دو کارآزمایی بالینی توسط فلاح حسینی و همکاران نیز گزارش شده است.^{۳۰،۳۲}

از آنجایی که یکی از نگرانی‌هایی که در مورد گیاهان و استفاده از آن‌ها وجود دارد، اثرات سمی آن بر ارگان‌های داخلی می‌باشد؛ بر آن شدیم تا در انتهای این مطالعه پس از تایید تأثیر اثرات ضد دیابتی مخلوط عصاره در دوره ۳۰ روزه، تغییرات سطوح آنزیمی و بافتی در ارگان اصلی تجزیه کننده و دفع کننده سموم یعنی کبد را بررسی کنیم. نتایج بیوشیمیایی و پاتولوژی در این مطالعه نشان می‌دهد که مخلوط عصاره گیاهی استفاده شده در دوزهای ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم هیچ تغییر معنی‌داری در سطح آنزیم‌های کبدی نداشته است. همچنین در بررسی هیستوپاتولوژی یافته غیر طبیعی در نمونه‌ها گزارش نشد. اما در دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، سطح AST و ALT به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است. همچنین در بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد نیز تغییرات نکروتیک پراکنده و التهابی گزارش شد. در مطالعه مشابه به بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره بذر شنبلیله بر روی سلول‌های کبد موش صحرایی پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که بذر شنبلیله حاوی مواد آنتی اکسیدان است و از ساختار

سلولی در برابر استرس اکسیداتیو حفاظت می‌کند.^{۳۱} ممتاز و همکاران در پژوهشی به بررسی میزان سمیت عصاره‌های مختلف میوه هندوانه ابوجهل پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که هندوانه ابوجهل در دوز هدف برای سلول‌های PC-۱۲ سمیت نداشته است؛ که این مورد را می‌توان به خواص آنتی اکسیدانی این میوه نسبت داد.^{۳۲} از طرفی در مطالعه‌ای که Khalik و همکاران در سال ۲۰۱۰ با هدف بررسی عوارض احتمالی استفاده طولانی مدت از این گیاه در موش انجام شد، مصرف بالای این گیاه برای خود موش اثرات مخرب، از جمله مرگ یا تغییرات میکروسکوپی نداشته. با اینحال در نوزادان متولد شده از این موش‌ها، اختلالات تولید مثلی و اثرات احتمالی تراژونیک مشاهده شده است.^{۱۶}

در مورد گیاه قره قاط نیز مطالعات بسیاری از خواص آنتی اکسیدانی آن در دسترس است. این گیاه سرشار از ترکیبات فنولی؛ آنتوسیانین و فالفونوئید است.^{۳۰} در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳ در پژوهشکده گیاهان دارویی، مشاهده شد که مصرف عصاره این گیاه در افراد دیابتی از افزایش قند خون جلوگیری کرده، سطح انسولین خون را افزایش می‌دهد ولی سمیت در کبد موش‌های مورد آزمایش مشاهده نشد.^{۳۳}

رشیدی و همکاران یک مطالعه مرور منظم با هدف بررسی اثربخشی گیاهان دارویی ضد دیابتی کشت شده در ایران را به انجام رساندند. در مجموع ۸۵ مطالعه (۱۸ مطالعه انسانی و ۶۷ مطالعه حیوانی) که ۶۲ گیاه را مورد بررسی قرار داده بودند وارد مرور منظم شدند. در بین مطالعات کارآزمایی بالینی، بهترین نتایج در کنترل هایپرگلیسمی در بیمارانی مشاهده شد که آلوئه ورا، هندوانه ابوجهل، کشمش ریواس، خارمریم و گزنه را مصرف کرده بودند.^{۳۴}

نتیجه‌گیری

نتایج ما ثابت می‌کند مخلوط عصاره‌های گیاهان شنبلیله، قره قاط، خارمریم، گزنه، بادرنجبویه و هندوانه ابوجهل در دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور واضحی سطح FBS و قند دو ساعته (۲hpp) را کاهش داده و دارای اثرات ضد دیابتی است. با این وجود در یک سر طیف، مطالعه حاضر نشان می‌دهد استفاده از دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم تأثیر معنی داری بر سطح اندکس‌های مرتبط با دیابت ندارد. در سر دیگر طیف مطالعه حاضر نشان می‌دهد با وجود این که دوز ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دارای اثرات ضد دیابتی است این دوز موجب ایجاد سمیت کبدی در موش صحرایی می‌شود.

تعارض منافع:

در این مطالعه هیچگونه تعارض منافی وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی:

این طرح با شناسه CERSMUZBA.RI 1400.001.

در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی البرز تأیید گردید

References

1. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. Diabetes: a 21st century challenge. The lancet Diabetes & endocrinology 2014;2(1): 56-64.
2. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care 2014;37(Supplement_1): S81-S90.
3. Baig AA, Benitez A, Quinn MT, Burnet DL. Family interventions to improve diabetes outcomes for adults. Annals of the New York Academy of Sciences 2015;1353(1): 89-112.
4. Ghorbani A. Best herbs for managing diabetes: a review of clinical studies. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 2013;49: 413-22.
5. Olaiya CO, Soetan KO. A review of the health benefits of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): Nutritional, Biochemical and pharmaceutical perspectives. Am J Soc Issues Humanit 2014;4: 3-12.
6. Ajabnoor MA, Tilmisany AK. Effect of *Trigonella foenum graecum* on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic mice. Journal of ethnopharmacology 1988;22(1): 45-9.
7. Ribes G, rard, Sauvaire Y, et al. Effects of fenugreek seeds on endocrine pancreatic secretions in dogs. Annals of nutrition and metabolism 1984;28(1): 37-43.
8. Abidov M, Ramazanov A, Jimenez Del Rio M, Chkhikvishvili I. Effect of Blueberin on fasting glucose, C-reactive protein and plasma aminotransferases, in female volunteers with diabetes type 2: double-blind, placebo controlled clinical study. Georgian Medical News 2006(141): 66-72.
9. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. World journal of hepatology 2014;6(3): 144.
10. Huseini HF, Fakhrzadeh H, Larijani B, Samani AS. Review of anti-diabetic medicinal plant used in traditional medicine. 2006.
11. Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, et al. Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an anti-oxidant agent. Diabetes, nutrition & metabolism 2002;15(4): 222-31.
12. Dar SA, Ganai FA, Yousuf AR, et al. Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. Pharmaceutical Biology 2013;51(2): 170-80.
13. Hirano T, Homma M, Oka K. Effects of Stinging Nettle Root Extracts and Their Steroidal Components on the Na⁺, K⁺-ATPase of the Benign Prostatic Hyperplasia1. Planta medica 1994;60(01): 30-3.
14. Khodsooz S, Moshtaghian J, Eivani M. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* (Lemon Balm) in alloxan-induced diabetic rats. 2016.
15. Weidner C, Wowro SJ, Freiwald A, et al. Lemon balm extract causes potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects in insulin-resistant obese mice. Molecular nutrition & food research 2014;58(4): 903-7.
16. Al-Ghathithi F, El-Ridi MR, Adeghate E, Amiri MH. Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. Molecular and cellular biochemistry 2004;261: 143-9.
17. Daradka H, Almasad MM, WSh Q, et al. Hypolipidaemic effects of *Citrullus colocynthis* L. in rabbits. Pakistan journal of biological sciences: PJBS 2007;10(16): 2768-71.
18. Pudziuvelyte L, Jakštas V, Ivanauskas L, et al. Different extraction methods for phenolic and volatile compounds recovery from *Elsholtzia ciliata* fresh and dried herbal materials. Industrial crops and products 2018;120: 286-94.
19. Gunjal S, Shirolkar SV. An overview of process parameters and spray drying agents involved in spray drying of herbal extracts. Paid J 2020;13: 102-18.
20. Kianbakht S, Abasi B, Dabaghian FH. Anti-hyperglycemic effect of *Vaccinium arctostaphylos* in type 2

- diabetic patients: A randomized controlled trial. *Forschende Komplementärmedizin/Research in Complementary Medicine* 2013;20(1): 17-22.
21. Moghadam FH, Vakili-Zarch B, Shafiee M, Mirjalili A. Fenugreek seed extract treats peripheral neuropathy in pyridoxine induced neuropathic mice. *EXCLI journal* 2013;12: 282.
 22. Huseini HF, Darvishzadeh F, Heshmat R, et al. The clinical investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) schrad fruit in treatment of Type II diabetic patients: a randomized, double blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 2009;23(8): 1186-9.
 23. Véniant MM, Komorowski R, Chen P, et al. Long-acting FGF21 has enhanced efficacy in diet-induced obese mice and in obese rhesus monkeys. *Endocrinology* 2012;153(9): 4192-203.
 24. Scudamore CL, Busk N, Vowell K. A simplified necropsy technique for mice: making the most of unscheduled deaths. *Laboratory animals* 2014;48(4): 342-4.
 25. Semwal DK, Kumar A, Aswal S, et al. Protective and therapeutic effects of natural products against diabetes mellitus via regenerating pancreatic β -cells and restoring their dysfunction. *Phytotherapy Research* 2021;35(3): 1218-29.
 26. Baquer NZ, Kumar P, Taha A, et al. Metabolic and molecular action of *Trigonella foenum-graecum* (fenugreek) and trace metals in experimental diabetic tissues. *Journal of biosciences* 2011;36: 383-96.
 27. Feshani AM, Kouhsari SM, Mohammadi S. *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. *Journal of ethnopharmacology* 2011;133(1): 67-74.
 28. Maghrani M, Zeggwagh N-A, Lemhadri A, et al. Study of the hypoglycaemic activity of *Fraxinus excelsior* and *Silybum marianum* in an animal model of type 1 diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* 2004;91(2-3): 309-16.
 29. Chung MJ, Cho S-Y, Bhuiyan MJH, et al. Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose-and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *British journal of nutrition* 2010;104(2): 180-8.
 30. Kumar S, Kumar D, Saroha K, et al. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmaceutica* 2008;58(2): 215-20.
 31. Kaviarasan S, Naik G, Gangabagirathi R, et al. In vitro studies on antiradical and antioxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seeds. *Food chemistry* 2007;103(1): 31-7.
 32. Ziaee M, Khorrami A, Khalighi-Sigaroudi F, Momtaz S. Study of the protective effects of *Citrullus colocynthis* against toxic effects of glucose in PC-12 cell line.
 33. Costa AF, Flor LS, Campos MR, et al. Burden of type 2 diabetes mellitus in Brazil. *Cadernos de saude publica* 2017;33: e00197915.
 34. Rashidi AA, Mirhashemi SM, Taghizadeh M, Sarkhail P. Iranian medicinal plants for diabetes mellitus: a systematic review. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS* 2013;16(9): 401-11.

The Anti-diabetic Effect of the Mixture of *Trigonella Foenum-graecum*, *Vaccinium Arctostaphylos*, *Silibum Marianum*, *dioica Urtica*, *Melissa Officinalis* and *Citrullus colocynthis* Extracts in the Diabetic Rat Animal Model and Evaluation of Possible Liver Complications.

Received: 23 Jun 2024; Accepted: 05 Oct 2024

Bahareh Tavakoli-far^{1,2}

Asieh Hosseini³

Hasan Fallah-Huseini⁴

Mahdi Mohammadi⁵

Mahdi Goudarzvand ^{2,6*}

1. Dietary Supplements and Probiotic Research Center, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

2. Department of Physiology - Pharmacology - Medical Physics, School of Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

3. Razi Drug Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran.

5. Medical Student, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

6. Non-communicable Diseases Research Centre, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran.

* Corresponding author
Associate Professor of Physiology
Postal Address
Alborz University of Medical Sciences
Campus, Western Bu-Ali, Moazan Blvd,
Karaj, Alborz Province, Iran.
Postal code: 3149969415
Cell Phone: +989125644620
Tel: +982634198302
Fax: ---
Email: m.godarzvand@abzums.ac.ir
Orcid Code: 0000-0002-4229-5148

Abstract

Background: Diabetes Mellitus is a metabolic disorder characterized by insulin deficiency or dysfunction. This study aimed to investigate the anti-diabetic effects of a mixture of extracts from "*Trigonella foenum-graecum*", "*Vaccinium arctostaphylos*", "*Silybum marianum*", "*Urtica dioica*", "*Melissa officinalis*", and "*Citrullus colocynthis*" in a diabetic rat model, as well as to evaluate potential liver complications associated with this extract.

Methods: In this experimental study, thirty male Wistar rats were rendered diabetic through intraperitoneal administration of alloxan (60 mg/kg). One week post-induction, diabetic rats were randomly assigned to five groups of six. The negative control group received distilled water via gavage, the positive control group received metformin (100 mg/kg), and three experimental groups received daily gavage of the plant extract mixture at doses of 150, 300, and 600 mg/kg, respectively. After 30 days of treatment, blood samples were collected from the tail to assess fasting blood sugar (FBS) and liver biomarkers. Subsequently, the rats were anesthetized with ketamine and xylazine, and liver tissue was prepared for histopathological evaluation using hematoxylin-eosin staining and light microscopy.

Results: The extract at doses of 300 and 600 mg/kg significantly reduced FBS and hsp2 levels. However, the 600 mg/kg dose resulted in a significant increase in liver enzymes and induced liver tissue damage.

Conclusion: The mixture of plant extracts demonstrated an anti-diabetic effect at a dosage of 300 mg/kg without toxic effects on the liver. These findings suggest potential therapeutic benefits of the extract in managing diabetes while highlighting the need for caution at higher dosages.

Keywords: Diabetes Mellitus, Antidiabetic Agents, Herbal Medicine, Liver Diseases, Rats