مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۶، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۰(شماره پی در پی ۱۴۵)

بررسی اثر عصاره برگ گیاه اسپند(*P.harmala*) بر آپوپتوز ناشی از استرپتوزوتوسین در بافت پانکراس رت‌های صحرایی

عالیه صفامنش[۱]، شهربانو عریان[۲،۱]، رامش احمدی[۲*]، کاظم پریور[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران،[۲]گروه علوم جانوری، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران،[۳]گروه علوم جانوری، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم ، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۹/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: کاهش توده سلول بتا در پاتوژنز دیابت نوع دو انسانی و در مدل‌های دیابت جوندگان نقش دارد. بنابراین، بررسی عصاره‌های گیاهی از این جهت که آیا مانع کاهش توده سلول‌های بتا و جزایر لانگرهانس می‌شوند اهمیت می‌یابد. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر عصاره برگ گیاه اسپند(*P.harmala*) بر آپوپتوز ناشی از استرپتوزوتوسین در بافت پانکراس رت‌های صحرایی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۵ انجام شد، تعداد ۳۲ سر موش رت نر ۱۰±۲۵۰ گرمی‌از انستیتوپاستور تهران تهیه و به ٤ گروه ۸ تایی شامل؛ کنترل، دیابتی، دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ، تجربی تحت تیمار با عصاره برگ اسپند، به طور تصادفی تقسیم شدند. رت‌های گروه‌های دیابتی، دوز ٦۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استپتوزوتوسین را دریافت نمودند. بعد از اطمینان از القاء دیابت در روز دهم تجویز عصاره متانولی برگ(۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به روش گاواژ به مدت ۲۸ روز برای گروه‌های تحت تیمار با عصاره، آغاز گردید. عصاره متانولی برگ اسپند به روش سوکسله استخراج و اجزاء استخراج شده عصاره برگ به وسیله HPLC آنالیز گردید. در طول دوره قندخون رت‌ها چک گردید و در انتهای آزمایش بافت پانکراس خارج و پس از طی مراحل بافتی و انجام رنگ‌آمیزی‌های بافتی عمومی‌هماتوکسیلین- ائوزینوفیل و اختصاصی اگنور، تعداد سلول‌های بتا شمارش و قطر جزایر اندازه‌گیری گردید. در نهایت داده‌های جمع آوری شده با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره برگ اسپند سرشار از ترکیبات فلاوونوئیدی است و اگرچه اختلاف معنی‌داری در غلظت سرمی‌گلوکز در روزهای دهم، چهاردهم و بیست و هشتم بین گروه دیابتی و گروه کنترل وجود دارد($p<0/001$)، ولی هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه دیابتی تحت تیمار با این عصاره و گروه دیابتی وجود نداشته است. هم‌چنین میانگین قطر جزایر در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل با اختلاف معنی‌دار($p<0/01$) کاهش یافته بود، اما اختلاف معنی‌داری بین گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره نسبت به گروه دیابتی وجود نداشت. نتایج در گروه تجربی تحت تیمار هم اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان نداد.

نتیجه‌گیری: عصاره برگ اسپند اگرچه حاوی فلاوونوئید و ترکیبات فنولی بود، اما بر خلاف پژوهش‌های گذشته، در گروه دیابتی نتوانسته بود عوارض ناشی از تجویز استرپتوزوتوسین را بهبود بخشد.

واژه های کلیدی: ترکیبات فلاوونوئیدی، عصاره برگ اسپند، دیابت، آپوپتوز

* **نویسنده مسول: رامش احمدی،** قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه علوم جانوری

Email: ramahmd@yahoo.com

مقدمه

وخامت پیشرفت عملکرد سلول بتا و کاهش شاخص توده سلولی و کاهش ترشح انسولین ناشی از گلوکز و نیز افزایش میزان آپوپتوز سلول‌های بتا و کاهش بقای این سلول‌ها در جزایر لانگرهانس پانکراس افراد دیابتی(۱) بدون در نظر گرفتن درمان، همان اتفاقی است که در دیابت نوع دو رخ می‌دهد(۲). تغییرات متابولیکی در دیابت احتمالاً منجر به اختلال تنظیم متیلاسیون DNA می‌شود که آسیب به DNA توأم با تغییر هویت را به دنبال دارد. این سلول‌ها احتمالاً سپس تحت تأثیر آپوپتوز قرار می‌گیرند و به نوبه خود تلاش بیشتری برای نئوژنز انجام می‌دهند تا فقدان توده اندوکرین جبران گردد(۳).

مطالعه باتلر و همکاران نشان داد که توده سلول‌های بتا در دیابت نوع ۲ کاهش می‌یابد و مکانسیم اساسی آن این است که آپوپتوز سلول‌های بتا افزایش یافته است. از آنجایی که نقص عمده‌ای که در دیابت نوع دو منجر به کاهش توده سلول بتا می‌شود، آپوپتوز افزایش یافته است، مادامی که تشکیل و رونویسی جزایر جدید طبیعی است، رویکردهای درمانی طراحی شده برای متوقف شدن آپوپتوز می‌تواند پیشرفت جدید قابل توجهی در زمینه مدیریت دیابت نوع دو داشته باشد، زیرا این رویکرد می‌تواند عملاً بیماری را معکوس کند و تا حدی گلایسمی‌را تسکین بخشد(٤). کاهش توده سلول بتا احتمالاً در پاتوژنز دیابت نوع دو انسانی(٥) و در مدل‌های دیابت در جوندگان نقش دارد(۷ و٦).

بنابراین، بررسی عصاره‌های گیاهی از این جهت که آیا مانع کاهش توده سلول‌های بتا و جزایر لانگرهانس می‌شوند، اهمیت می‌یابد. یکی از این گیاهان اسپند است که زیستگاه آن در مناطق نیمه خشک از جمله در ایران، مناطق استپی و خاک‌های شنی می‌باشد(۸) و منشاء اولیه اسپند آسیای مرکزی است(۹). یکی از مواد مؤثره این گیاه که بیشتر در دانه‌ها و ریشه‌ها یافت می‌شود بتاکاربولین‌هایی از خانواده آلکالوئیدها هستند. ویژگی‌های مولکولی آلکالوئیدها در این گیاه بسیار متفاوت است و دارای میزان بالای غلظت هارمین و هارمول در ریشه‌ها و میزان بالای هارمین و هارمالین در دانه‌ها می‌باشد. به طرز جالب توجهی، هارمالین تقریباً به طور انحصاری در دانه‌ها وجود دارد، در حالی که هارمول به طور غالب در ریشه‌ها و به میزان خیلی کم در ساقه‌ها وجود دارد. هارمالول همچنین در میوه‌ها و دانه‌ها یافت می‌شود. مقادیر جزئی تتراهیدروهارمین در دانه‌ها وجود دارد، اما هارمن(۱ــ متیل ـ β ــ کاربولین) و نورهارمن(β ــ کاربولین) در دانه دیده نشده است. طبق گزارش‌های موجود غلظت β ــ کاربولین‌های موجود در دانه بالاتر و هم‌چنین دارای ویژگی‌های کیفی متفاوتی است(۱۰) که این تفاوت‌ها و اختلافات به دلیل اختلاف در مراحل پردازش گیاه یا روندهای آنالیز و عواملی هم‌چون موقعیت جغرافیایی و وضعیت رشد گیاه می‌باشد(۱۱).

پگانوم هارمالا یک گیاه دارویی با خواص ضدمیکروبی، ضد التهابی و ویژگی‌های ضددردی

است(۱۲). این گیاه هم‌چنین برای درمان فشار خون بالا و بیماری‌های قلبی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۳)، هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر عصاره برگ گیاه اسپند(*P.harmala*) بر آپوپتوز ناشی از استرپتوزوتوسین در بافت پانکراس رت‌های صحرایی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۹۵ انجام شد، تعداد ۳۲ سر موش رت نر ۱۰±۲۵۰ گرمی از انستیتوپاستور تهران تهیه شد و بعد از یک هفته استراحت در شرایط استاندارد آزمایشگاهی در حیوان خانه مرکز تحقیقات رازی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران به ٤ گروه ۸ تایی به طور تصادفی تقسیم شدند؛ گروه کنترل منفی (D): دیابتی شدند و هیچ دارویی دریافت نمی‌کردند، گروه کنترل مثبت (C): نرمال بودند و هیچ دارویی دریافت نمی‌کردند، گروه نرمال + عصاره برگ(L) : نرمال بودند و عصاره برگ دریافت می‌کردند و گروه دیابتی + عصاره برگ(DL): دیابتی بودند و عصاره برگ دریافت می‌کردند.

گیاه اسپند پس از جمع‌آوری از بیابان‌های اطراف زاهدان در فصل بهار به تهران منتقل و در دمای محیط خشک گردید. سپس برگ‌ها از شاخه‌ها جدا و جهت عصاره‌گیری به مرکز تحقیقاتی گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج ارسال گردید.

در این روش ابتدا نمونه گیاهی جمع‌آوری شده در هرباریوم مرکزی ایران(TARI) تأیید و سپس با استفاده از خردکن، خرد شده و سپس مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه در درون انگشتانه ریخته و در قسمت میانی سوکسله قرار داده شد. مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر متانول در درون بالن ریخته و سپس برای مدت ٤ ساعت عصاره‌گیری طی ۲۰ بار سیفون شدن ادامه یافت و در انتها حلال با تبخیر در خلاء از عصاره جدا و در یخچال نگهداری شد و پس از آن جهت انجام آنالیزهای فیتوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت.

برای شناسایی این متابولیت‌ها از آزمون شینودا استفاده شد و برای این کار، حدود ۱ گرم از عصاره متانولی خشک ابتدا ۳ بار به وسیله ٤ میلی‌لیتر اتر دوپترول شستشو داده شد تا رنگ و چربی عصاره گرفته شود و به عصاره ۲ میلی‌لیتر مخلوط(۵۰:۵۰) آب ـ متانول اضافه شد. در مرحله بعد ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ افزوده شد و ظهور رنگ قرمز نشانگر حضور آنتوسیانین بود. با افزودن مقدار کمی پودر منیزیوم و ایزوبوتانول محلول دو فازی می‌شود، اگر فاز رویی قرمز شود نشانگر حضور فلاونوئید و اگر فاز زیرین قرمز باشد نشانگر حضورآنتوسیانین است، در صورت قرمز بودن هر دو فاز دلیل بر این است که گیاه هم دارای آنتوسیانین و هم فلاونوئید است.

نمونه مورد نظر با دستگاه کروماتوگرافیKNAUER, HPLC با ستون C_{18} و فاز متحرک ایزوپروپیل الکل، استونیتریل، آب، فرمیک اسید

(۳:۳۰۰:۱۰۰:۱۰۰) و سرعت جریان فاز متحرک ۱میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج ۳۳۰ نانومتر آنالیز شد و کروماتوگرام‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

موش‌های صحرایی به صورت درون صفاقی استرپتوزوتوسین(سیگما آلدریچ ـ آمریکا) حل شده در آب مقطر را با تک دوز ٦٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند. جهت اطمینان از دیابتی شدن موش‌ها تست اندازه‌گیری قند خون از ٤٨ ساعت بعد از تزریق دارو انجام گرفت و موش‌هایی که قند خون بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر داشتند به عنوان موش‌های دیابتی در نظر گرفته شدند. علایم دیابت شامل پرنوشی و پر ادراری پس از گذشت ٥ الی ۷ روز آشکار گردید، قندخون در طول دوره نیز چک می‌گردید.

اندازه‌گیری قندخون به وسیله یک دستگاه گلوکومتر(Accu-Chek ساخت Roche Diabetes Care, Inc.) صورت گرفت. تست قندخون ناشتا در روزهای دهم، چهاردهم و بیست و هشتم صورت گرفت، جهت انجام این تست، موش‌ها از عصر روز قبل در وضعیت ناشتا قرار داشتند و در ساعت ۸ صبح روز بعد تست قندخون از انتهای دم موش انجام گرفت.

دوز مورد نظر عصاره برگ(۱۵۰میلی گرم بر کیلوگرم)(١٤) به وسیله آب مقطر به حجم رسید و برای مدت ۲۸ روز به صورت روزانه به حیوان گاواژ شدند.

ابتدا از قسمتی از بافت پانکراس که در مجاورت طحال قرار داشت جهت ارزیابی‌های بافتی و سپس از مابقی بافت جهت مطالعه آپوپتوز نمونه‌برداری صورت گرفت.

در مرحله اول؛ ۰/۲۵ گرم تریپسین برداشته و در ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی حل گردید، آنزیم DNAase نیز رقیق و سپس ۵۰ ماکرولیتر DNAase به ۵ میلی‌لیتر تریپسین اضافه شد؛ در ادامه ۱۰۰ ماکرولیتر از این مخلوط آنزیمی بر روی بافت پانکراس شسته شده با سرم فیزیولوژی ریخته و با قیچی کوچک و ظریفی بافت کاملاً خرد گردید. طی مدت ۳۰ دقیقه سه مرتبه محتویات تیوپ با میکروپیپت پیپتاژ شد و پس از آن نمونه‌ها به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و هر ٥ دقیقه یک مرتبه پیپتاژ گردیدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه به هر کدام از میکروتیوب‌ها ٥ ماکرولیتر سرم بز زده شد تا آنزیم غیر فعال گردد، در ادامه پس از ته نشینی بقایای محتویات میکروپیپت؛ مایع رویی جمع‌آوری و به میکروتیوب دیگری منتقل و در دستگاه سانتریفیوژ با ۱۵۰۰ دور در دقیقه ، به مدت ٥ دقیقه در دمای ٤٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. در این حالت مایع رویی دور ریخته شد و به بقایای مانده در میکروتیوب، سرم فیزیولوژی اضافه و به یخچال منتقل گردید. ۱۰ دقیقه قبل از انجام فلوسایتومتری به آن ۱۰۰ لاندا بافر، ۱۰ لاندا پروپیدیوم یدید (PI) و ٥ لاندا انکسین اضافه و وارد مرحله بررسی میزان آپوپتوز به وسیله دستگاه فلوسایتومتری گردید.

ابتدا سلول‌های سینگل شده به تعداد ۱ میلیون در ۱ میلی‌لیتر از محلول بایندینگ بافر سوسپانس شدند. سپس ۱۰۰ ماکرولیتر از آن که حاوی ۱۰۰۰۰۰ سلول است به لوله فلوسایتومتری انتقال پیدا کرد. در مرحله بعد ۵ ماکرولیتر از محلول انکسین – ایزوتیوسیانات فلورسن(Annexin-FITC) کیت به لوله اضافه و لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط در اتاق تاریک انکوبه شدند. سپس ۱میلی‌لیتر بایندینگ بافر به لوله ها افزوده و در دستگاه سانتریفیوژ با ۱۵۰۰ دور بر دقیقه شستشو داده شد. به رسوب سلولی باقیمانده ۱۰۰ ماکرولیتر از بایندینگ بافر و سپس ۵ ماکرولیتر از محلول پروپیدیوم یدید (PI) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط و اتاق تاریک انکوبه شدند. سپس در دستگاه فلوسایتومتری(برندBD FACS Calibur) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در نرم افزار فلوجی آنالیز شدند.

برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک بافت در محلول بافر فرمالین ۱۰ درصد پایدار شد. بعد از گذراندن مراحل بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطعی به قطر ۵ میکرون تهیه گردید، سپس رنگ‌آمیزی صورت گرفت.

بر روی لام‌های تهیه شده رنگ‌آمیزی معمول هماتوکسیلین و ائوزین(H&E) صورت گرفت. مراحل رنگ‌آمیزی H&E معمول، به ترتیب شامل؛ شناورسازی در دو ظرف گزیلول(هر یک ۱۰ دقیقه)، الکل ۹۶ درصد(۵ دقیقه)، الکل ۱۰۰ درصد(۵ دقیقه) و هماتوکسیلین(۱۰ دقیقه)، یک بار وارد کردن در ظرف اسید الکل و بعد کربنات لیتیم، سه مرحله شستشو با آب، ائوزین(۳ دقیقه)، وارد کردن در ظرف الکل ۹۶، ۹۶ و ۱۰۰ درصد و در نهایت شفاف سازی در دو ظرف گزیلول بود.

لام‌ها در محلول نیترات نقره به مدت ۳۸ دقیقه در محیطی تاریک و مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. محلول مورد استفاده شامل دو بخش محلول نیترات نقره ۵۰ درصد و یک قسمت ژلاتین ۲ درصد در اسید فرمیک ۱ درصد است. از آب مقطر برای تهیه همه محلول‌ها استفاده می‌گردد. سپس لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در محلول ۱ درصد کلرید طلا قرار داده می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی، اسلایدها با آب مقطر شسته، به وسیله الکل و زایلن دهیدراته و در پایان مانت گردیدند. تعداد سلول‌های بتا در مقاطع رنگ‌آمیزی شده، با کمک میکروسکوپ نوری المپیوس شمارش گردید. جهت بررسی قطر جزایر نیز با کمک میکرومتر چشمی میکروسکوپ نوری، بر حسب میکرومتر تعیین و در انتها میانگین قطر جزایر و میانگین تعداد سلول‌های بتا ثبت شد.

داده‌های جمع آوری شده با نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

1- Cover Slipping

یافته‌ها

ترکیبات شیمیایی عصاره متانولی برگ اسپند که به روش سوکسله عصاره گیری شده است. این نتایج نشان می‌دهد عصاره برگ حاوی ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی و درصد آنتی اکسیدانی بالا است(جدول ۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اختلاف معنی‌داری در غلظت سرمی گلوکز در روزهای دهم، چهاردهم و بیست و هشتم بین گروه دیابتی و گروه کنترل وجود دارد($p<0/001$)(نمودار۱). هم‌چنین هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در این سه روز بین گروه تجربی تحت تیمار با عصاره برگ و گروه کنترل وجود ندارد. از سوی دیگر تجویز عصاره برگ در گروه دیابتی تحت تیمار با این عصاره نیز منجر به کاهش قندخون نشده و هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین این گروه و گروه دیابتی وجود نداشت. در نتیجه، عصاره برگ نتوانسته است غلظت‌های سرمی گلوکز را در موش‌های دیابتی کاهش دهد و در موش‌های نرمال نیز تغییری ایجاد نکرده است (نمودار۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان آپوپتوز بین گروه دیابتی و گروه کنترل وجود دارد($p<0/01$)(شکل ۱)، این در حالی است که در گروه تجربی نرمال تحت تیمار با عصاره برگ نیز با سطح معنی‌داری($p<0/05$) نسبت به گروه کنترل آپوپتوز القاء شده بود و در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ اگرچه نسبت به گروه دیابتی میزان آپوپتوز کاهش یافته بود($p<0/05$)، اما هم‌چنان درصد آپوپتوز بالا بود.

مجموع بررسی‌های مطالعه حاضر طی رنگ‌آمیزی‌های عمومی و اختصاصی بافت پانکراس نشان می‌دهد که در گروه کنترل(C)؛ جزایر لانگرهانس نرمال و به شکل طبیعی و مجاری و عروق خونی نرمال می‌باشند. بخش برون ریز با سلول های هرمی و گرانول‌های ترشحی در راس آن‌ها مشاهده می‌شود و با درصدهای طبیعی آلفا و بتا وجود دارند که به رنگ بنفش دیده می‌شوند. سلول‌های آسینی یا ترشحی برون ریز به شکل هرمی با دانه‌های حاوی آنزیم‌های ترشحی در راس سلول‌ها به شکل دانه‌های قرمز رنگ تجمع یافته‌اند و پراکندگی بافتی خاصی مشاهده نشده است. در رت‌های گروه دیابتی(D)، جزایر لانگر هانس از نظر اندازه کوچک، سلول‌های بتا تقریباً به طور کامل از بین رفته بودند و منظره بافتی جزایر به رنگ قرمز بود که نشان دهنده بالاتر بودن تعداد سلول‌های آلفا نسبت به سلول‌های بتا می‌باشد. هم‌چنین آتروفی و کوچکی جزایر مشهود بود. تیغه‌های ترابکولار انسجام خود را تا حدودی از دست داده بودند، میزان رگ‌ها و خونریزی بافت افزایش یافته و در بسیاری از سلول‌های جزایر لانگرهانس هسته قابل مشاهده نبود. جزایر لانگرهانس کوچک و دچارآتروفی شده و معدود جزایری هم که وجود داشتند اندازه آنها کوچک بود. تعداد سلول‌های بتای آنها نیز کم شده بود. از سوی دیگر، در گروه تجربی تحت تیمار با عصاره متانولی برگ(L)؛ سلول‌های

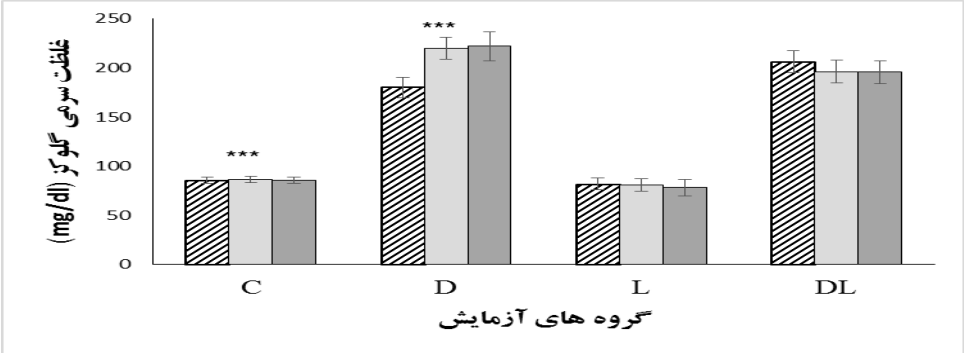
ترشحی بخش برون ریز تقریباً به میزان زیادی تخریب شده و سلول‌های معدودی که(در بعضی نمونه‌ها) دیده می‌شود انسجام کامل نداشتند و پخش شده بودند. سلول‌های آلفا و بتا در(در بعضی از لام‌ها) به هیچ وجه قابل مشاهده نبودند. در کل درصد سلول‌های بتا در این گروه به حدود ٦٥ درصد می‌رسید و در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ(DL)، در بعضی نمونه‌ها بخش برون ریز و سلول‌های ترشح آنزیمی نرمال و به شکل هرمی با قاعده حاوی میتوکندری و اندامک‌ها و راس حاوی گرانول‌های ترشحی دیده می‌شد، اما برخی از سلول‌های برون ریز از حالت هرمی خارج شده و جزایر لانگرهانس نسبت به حالت طبیعی کمتر دیده می‌شود و از نظر نظم سلول‌های آلفا و بتا تا حدودی بهم ریختگی مشاهده گردید، اما در جزایر مشاهده شده سلول‌های بتا بیشتر از حالت دیابتی است و درصد سلول‌های بتا در این گروه به حدود ١٥ درصد می‌رسید. در نتیجه عصاره برگ اسپند در گروه تجربی و دیابتی منجر به تخریب بافتی شده است که میزان این تخریب در گروه دیابتی به دلیل اثرات مخرب STZ، تشدید شده است(شکل٢).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میانگین قطر جزایر در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل با اختلاف معنی‌دار($p<0/01$) کاهش یافته است. اگرچه اختلاف معنی‌داری بین گروه تجربی دریافت کننده عصاره برگ(L) و گروه کنترل مشاهده نگردید. در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره نیز نسبت به گروه دیابتی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، بدین معنا که عصاره برگ در این گروه(DL) نتوانسته است عوارض ناشی از تجویز STZ را بهبود بخشد(نمودار٢).

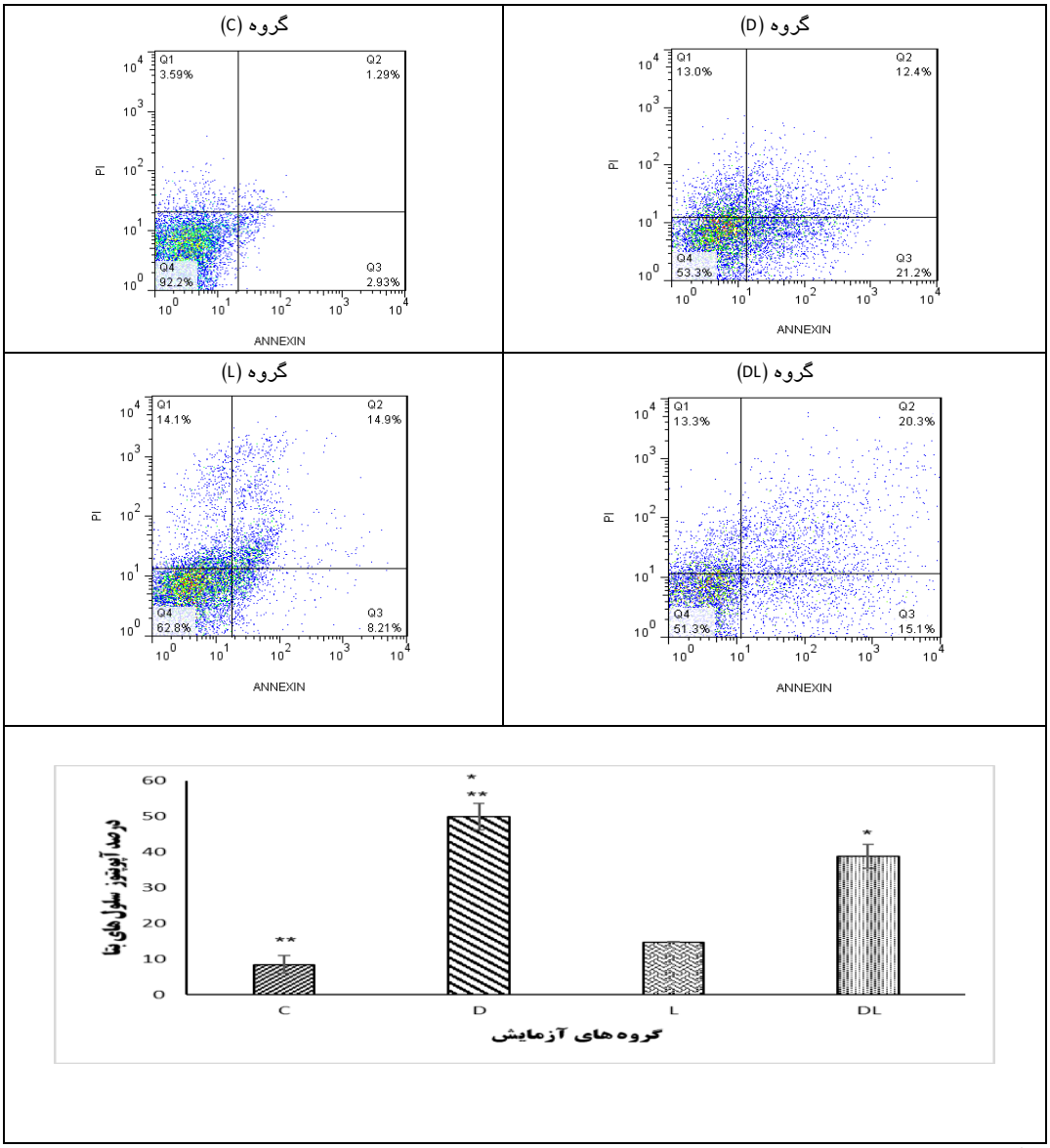
نتایج تحقیق حاضر نشان داد که میانگین تعداد جزایر در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل با اختلاف معنی‌دار($p<0/05$) کاهش یافته است. هم‌چنین اگرچه تعداد جزایر در گروه تجربی دریافت کننده عصاره برگ(L) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است، اما این اختلاف معنی‌دار نبود. در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره نیز نسبت به گروه دیابتی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، بدین معنا که عصاره برگ در این گروه(DL) نتوانسته است کاهش تعداد جزایر ناشی از تجویز STZ را بهبود بخشد(نمودار٣).

جدول ١: ترکیبات زیست فعال عصاره متانولی برگ اسپند زاهدان

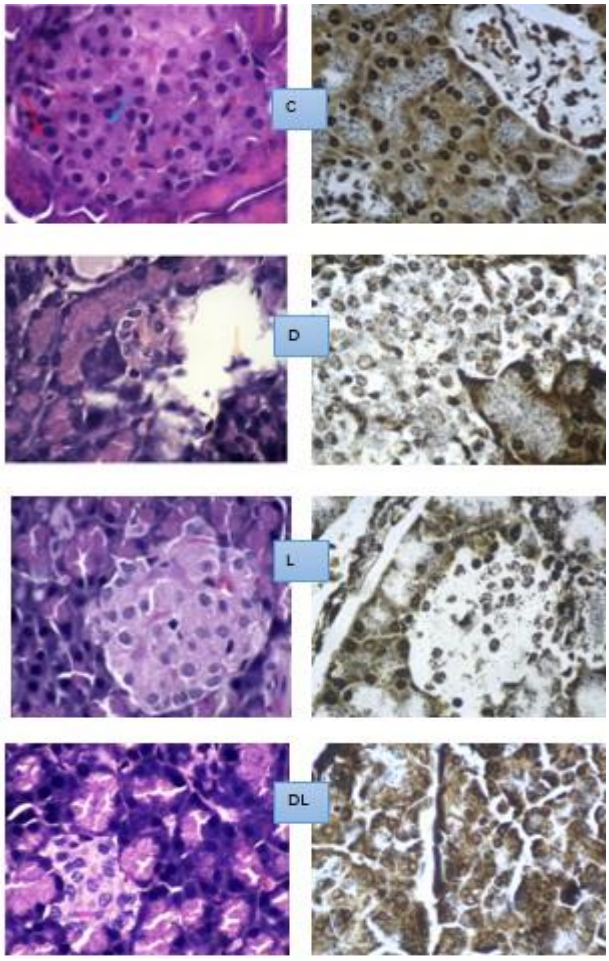
عصاره		برگ
درصد عصاره		٣١/٧
آلکالوئید(درصد)	هارمالول	٠/٠٢٦
	هارمول	---
	هارمن	٠/٠١١
	هارمالین	٠/٠٥
	هارمین	٠/٠٥٥
کل فلاوونوئیدی(برحسب میلی گرم کوئرستین معادل در میلی گرم عصاره)		٢٥/٨٤
کل فنولی (بر حسب میلی گرم اسید گالیک در میلی گرم عصاره)		٣٢/٨٤



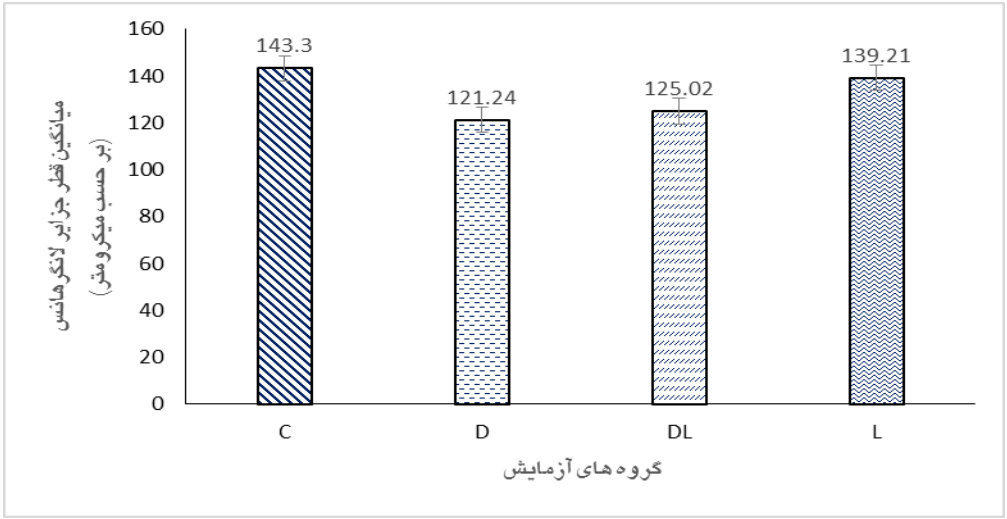
نمودار۱: نتایج سنجش گلوکز در گروه های تجربی و دیابتی. در این نمودار غلظت سرمی گلوکز بر حسب(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) در روز های دهم، چهاردهم و بیست و هشتم در گروه کنترل(C)؛ گروه دیابتی(D)، عصاره برگ (L) و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ(DL) نشان داده شده است



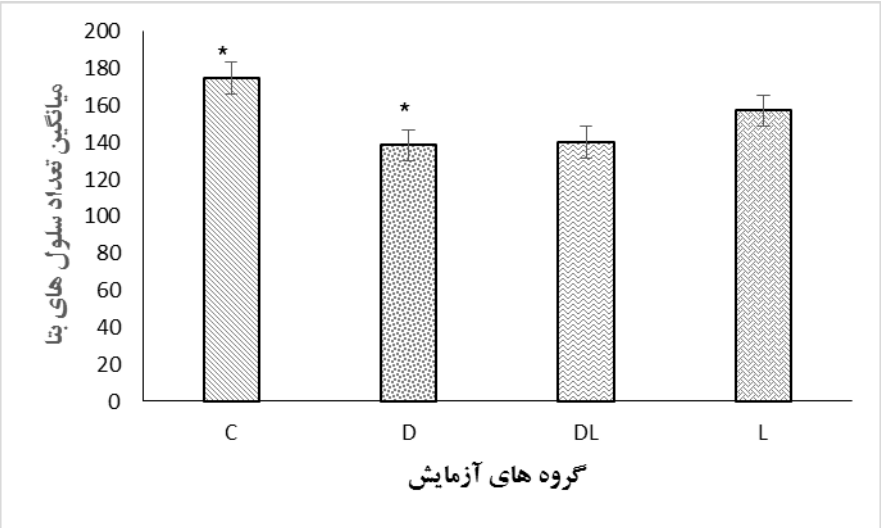
شکل۱: تأثیر عصاره متانولی برگ اسپند بر میزان آپوپتوز در رت‌های نرمال و دیابتی در گروه های کنترل(C)؛ گروه دیابتی(D)، عصاره برگ(L) و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ(DL)



شکل۲: جزایر لانگرهانس در گروه های کنترل(C)؛ گروه دیابتی(D)، عصاره برگ (L) و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ(DL) با بزرگنمایی ۴۰x



نمودار ۲: میانگین قطر جزایر لانگرهانس (برحسب میکرومتر) پس از ٤ هفته در گروه های؛ کنترل(C)، گروه دیابتی(D)، عصاره برگ (L) و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ(DL)



نمودار۳: میانگین تعداد جزایر لانگرهانس پس از ٤ هفته در گروه های کنترل(C)، گروه دیابتی(D)، عصاره برگ (L) و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ(DL)

بحث

امروزه لزوم پرداختن به انجام تحقیقاتی که نتیجه آن منجر به کشف داروی جدید در زمینه درمان دیابت گردد، محرز است. در این راستا پژوهش‌های صورت گرفته در مورد اثرات قطعی عصاره برگ اسپند در بیماری دیابت و آپوپتوز ناشی از آن در پانکراس؛ بررسی نشده و پژوهش‌های بیشتر بر روی دانه این گیاه متمرکز بوده‌اند. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی اثر عصاره برگ گیاه اسپند(*P.harmala*) بر آپوپتوز ناشی از استرپتوزوتوسین در بافت پانکراس رت‌های صحرایی بود.

نتایج آنالیز فیتوشیمیایی این پژوهش نشان دهنده حضور فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی در عصاره برگ گیاه اسپند در مقادیر بالا نسبت به بتاکاربولین‌هایی از خانواده آلکالوئیدها در مقادیر بسیار اندک در برگ این گیاه می‌باشد. علی‌رغم این که درصد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این عصاره بالا است، اما نتایج مطالعه حاضر به جز در موارد محدود برخلاف بسیاری از پژوهش‌ها است که فلاونوئیدها را به عنوان آنتی‌اکسیدان(۱۵)، ضد التهاب(۱٦)، ضدانسداد(۱۷) و محافظت کننده عروق کرونر و نیز فاکتوری بر ضد سندروم متابولیک معرفی کرده‌اند(۱۸) در واقع بر اساس پژوهش‌های قبلی، این اثرات سودمند ذکر شده فلاونوئیدها را به نامزدهای

خوبی برای توسعه مواد غذایی عملکردی جدید با پتانسیل‌های محافظتی و ممانعتی در برابر بیماری‌های مختلف تبدیل کرده است(۱۹) اگرچه در پژوهش حاضر، تیمار رت‌های دیابتی با عصاره برگ اسپند سرشار از فلاوونوئیدها، نه تنها منجر به بروز علایم بهبود نشد، بلکه حتی در رت‌های نرمال تحت تیمار با این عصاره نیز تخریب بافتی پانکراس تاحدی مشهود بود. به طوری‌که محققان در گزارش‌های خود ابراز داشته‌اند این فرم از فلاونوئیدها که در گیاهان یافت می‌شود(مثلا گلیکوزیدها یا در برخی موارد؛ آگلیکون) فرم بیواکتیو آنها نمی‌باشد، اما فرم‌های کونژوگه و متابولیت‌های آنها به وسیله روده قابل جذب می‌باشد به ویژه شواهد قدرتمندی وجود دارد مبنی بر دگلیکوزیلاسیون و متابولیسم گسترده آگلیکون‌ها هم‌چون کوئرستین، هسپرتین، نارینژنین و اپی‌کتچین به شکل گلوکورونیدها، سولفات ها و o ـ متیله شده که پس از جذب از روده باریک مجددا به کبد باز می‌گردند(۲۰)، تغییر شکل بیشتر در کولون صورت می‌گیرد، جایی که میکروفلور دستگاه گوارش فلاوونوئیدها را به اسیدهای فنولی ساده تقسیم می‌کند که احتمالاً جذب و متعاقباً برای متابولیسم بیشتر مجدداً به کبد می‌روند(۱۵). هم‌چنین بیشتر پژوهش‌ها که تاکنون گزارش‌هایی در مورد اثرات فلاوونوئیدها ارایه کرده‌اند آنها را دسته‌ای از ترکیبات با خاصیت القاء ترشح انسولین و نیز کاهنده خون و بهبود دهنده دیابت معرفی کرده‌اند، به طوری که برخلاف نتایج مطالعه حاضر، در پژوهشی مصرف فلاونوئید ژنیستین[1] به طور معنی‌داری هایپرگلایسمی، اختلال تحمل گلوکز و سطوح انسولین خون را در دیابت ناشی از STZ بهبود می‌بخشد و این بهبودی با افزایش توده سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس و تکثیر و بقاء آنها همراه است(۲۱). مطالعه دیگری نشان داده بود مولکول‌هایی هم‌چون آنتوسیانین‌ها و آنتوسیانیدها که متعلق به خانواده فلاونوئیدها می‌باشند دارای اثرات ترشح کنندگی انسولین بوده و با توجه به ساختار آنها اثرات متفاوتی دارند. به نظر می‌رسد تعدادی از گروه‌های هیدروکسیل در حلقه B آنتوسیانین‌ها نقش مهمی در توانایی آنها برای ترشح انسولین داشته باشند(۲۲). این که فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی که دارند، بتوانند قند خون را کاهش دهند یا اثرات محافظتی بر سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس اعمال کنند در پژوهش‌هایی که بر روی سایر گیاهان نیز صورت گرفته(۲۵ـ۲۳)، نیز ثابت شده است. هم‌چنین رستوراترول[2] که یک ترکیب گیاهی فنولیک است دارای اثرات مفید بالقوه از جمله جلوگیری از دیابت بوده و بعضی از عوارض دیابت را کاهش می‌دهد. این ترکیب بر ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس دخالت دارد، اگرچه نتایج حاصل شده بسیار بحث برانگیز هستند(۲۶). هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر، پژوهش‌های پاتولوژیکی در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲، فقدان ۵۰ ـ ۲۵ درصد سلول‌های بتا را نشان می‌دهد(۲۷) که به وسیله سایر

1-Genistein
2-Resveratrol

پـژوهش‌هـای مـورد بحـث قـرار گرفتـه اسـت(۲۸). هم‌چنین در پژوهش‌هایی کـه مـرتبط بـا BMI بیمـاران دیابت و افراد نرمـال بـوده اسـت کـاهش معنـی‌دار در توده سـلول‌هـای بتـا(۲۹) و افـزایش سـه برابـری در آپوپتوز سلول‌های بتا مشاهده گردیده اسـت(۲۹). ایـن پژوهش نشان داد تحت مکانیسمی که نامشخص است، توده سلول‌های بتا در دیابـت نـوع ۲ کـاهش و میـزان آپوپتوز سلول‌های بتا افـزایش یافتـه اسـت(۵). برخـی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در هر دو شکل دیابت بیان میانجیگری کننده‌های التهـابی بیـرون از جزایـر[1] (بـه ویژه IL-1β) مسـیر نهـایی آپوپتـوز سـلول‌هـای بتـا را هدف قرار داده و باعث فقدان تدریجی سلول‌های بتا و دیابت می‌گردنـد(۳۰). نتـایج مطالعـه‌ای نشـان داد کـه تـوده سـلول بتـا در دیابـت نـوع ۲ کـاهش مـی‌یابـد و مکانیسم اصلی آن آپوپتوز افزایش یافته در سلول‌های بتا می‌باشد. در نتیجـه تشـکیل جزایـر جدیـد رویکـرد درمانی جدیدی برای متوقف نمودن آپوپتوز می‌باشـد، چرا که احتمالاً روند دیابت را معکوس می‌کند، نـه ایـن که فقط گلایسمی را موقتاً کاهش دهد(٤). هم راستا بـا نتـایج مطالعـه حاضـر، پـژوهش‌هـای بـافتی هونـگ و همکـاران نشـان داد کـه در رت‌هـای دیـابتی جزایـر لانگرهـانس دچـار تغییـرات نکـروزی و انقباضـی می‌شوند. ایمینواسـی پوزتیـویتی[2] ضـعیفی در تعـداد کمی از سلول‌های بتـا در جزایـر لانگرهـانس رت‌هـای کنترل دیابتی وجود داشت که ناشی از میزان نسبتاً کم سلول‌هـای بتـای انسـولین- مثبـت[3] و کـاهش نسـبتی سلول‌های β /α در مقایسـه بـا رت‌هـای گـروه کنتـرل بود(۳۱). در مطالعه حاضر نیز با کاهش قطر جزایـر و تعداد سلول‌های بتا در گروه D تحت تجویز STZ و نیز عدم بهبودی این فاکتورها در گروه DL پس از تیمار با عصاره برگ، نتیجه گرفته شد که نتایج این مطالعه هم برخلاف پژوهش‌هایی است کـه فلاونوئیـدها را عامـل بهبود وضعیت بافتی جزایر لانگرهانس معرفی کرده‌اند برای مثال، در پژوهش‌های بافتی هاهم و همکـاران بـر روی جزایر لانگرهانس، عصاره متـانولی گیـاه میخـک صدپر[4] باعث بهبود گرانولاسـیون سـلول‌هـای بتـا و کاهش سطوح گلـوکز خـون بـا متـأثر سـاختن جزایـر لانگرهانس گردیده بود(۳۲). آنها این اثرات را به دلیـل حضور فلاونوئیدها و ترکیبات فنولی دانسته‌اند که بـه لحاظ بـافتی، وضـعیت ایـن جزایـر را بهبـود بخشـیده است(۳۳). زیرا طبق بررسی‌های صورت گرفته، تجویز ایـن ترکیبـات مـی‌توانـد رادیکـال‌هـای آزاد را بـه دام انداخته و استرس اکسیداتیو را کـاهش دهـد(۳٤). ایـن ترکیبـات مـی‌تواننـد آنـزیم کاتـالاز را افـزایش داده و بهبود بخشند و تعداد گونه‌های اکسیژن واکنشی(ROS) را کاهش دهند، بنابراین می‌توانند به حفـظ یکپـارچگی سلول و افزایش بقای آن کمک کنند(۳۵). مطالعه نجاتی و همکاران که بازسازی جزایر لانگرهانس پانکراس را ناشی از ترکیبـات آلکالوئیـدی و فلاونوئیـدی بارهنـگ دانسته‌اند(۳٦). هم‌چنین برخلاف نتایج مطالعه حاضـر، بعضی بررسـی‌هـا نشـان داده‌انـد کـه مصـرف رژیـم غذایی حاوی فلاونوئید ریسـک ابـتلا بـه بیمـاری‌هـای

1- Intra-Islet
2-Insulinimmunopositivity
3-Insulin-Positive
4-S. Oleana Pericarp

مزمن را کاهش می‌دهد و یا آن‌ها را مهار می‌کند. فعالیت ضدالتهابی فلاونوئیدها از طریق مکانیسم‌های متعدد درگیر در تعدیل سیگنال‌های التهابی، کاهش تولید مولکول التهابی، کاهش به کارگیری و فعال‌سازی سلول‌های التهابی، تنظیم عملکرد سلولی و خواص آنتی‌اکسیداتیو آنها می‌باشد(۳۸ و۳۷). مطالعه بهاندری و همکاران نشان داد که گیاه بیرنگ کابلی[1] از خانواده میرسیناسه در رت‌های مبتلا به دیابت ناشی از STZ اثرات محافظتی آنتی‌اکسیدانی در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده تحت شرایط هایپرگلایسمیک داشته و از کاهش تعداد سلول‌های بتا جلوگیری می‌کند و خواص ضددیابتی دارد(۳۹). پژوهش‌های ایلسون و همکاران و بررسی‌های گرکا و همکاران ابراز داشته‌اند که دیابت نوع دو می‌تواند منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شود و احتمالاً در این شرایط ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما کاهش یافته است. تحت شرایطی که آنتی‌اکسیدان‌ها حضور دارند و رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند نه تنها مفید هستند بلکه هم‌چنین نقش عمده‌ای را در معکوس نمودن آسیب‌های ناشی از دیابت ایفا می‌کنند(٤١ و ٤٠). بنابراین نتایج مطالعه حاضر برخلاف بسیاری از پژوهش‌های صورت گرفته در قبل در زمینه اثرات سودمند فلاوونوئیدها و ترکیبات فنولی بر بافت پانکراس و کاهش قندخون بوده و به طوری که گزارش‌ها نشان می‌دهد جذب فلاوونوئیدها و متابولیسم آنها در شرایط in vivo به نوع سلول بستگی دارد و این که آیا در تعامل با غشاء سلولی باشند یا وارد سیتوزول شوند، اهمیت ویژه‌ای دارد زیرا اخیراً از فلاوونوئیدها به عنوان تعدیل کننده‌های بالقوه آبشارهای سیگنالینگ درون سلولی یاد می‌شود(۱۵). هم‌چنین این احتمال وجود دارد که این نتایج ناشی از اختلاف در طراحی آزمایش و یا انتخاب دوز باشد، مثلاً اگرچه در دوز منتخب ما در این مطالعه درصد ترکیبات آنتی اکسیدانی و فلاوونوئیدی بالا بود اما پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های بعدی دوزهای متفاوتی تست گردد.

بررسی بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و ترسیم مسیرهای مولکولی القاء شده به وسیله آنها در سلول‌های بتا می‌تواند مشخص کند که فلاوونوئیدهای برگ اسپند تحت چه مکانیسمی منجر به تخریب بافتی پانکراس در رت‌های دیابتی و نرمال گردیده‌اند.

نتیجه‌گیری

با توجه به اثرات برگ گیاه اسپند در افزایش قند خون و القاء آپوپتوز در پانکراس رت‌ها علی‌رغم حضور ترکیبات آنتی اکسیدانی و پلی فنولی، برگ این گیاه برای درمان دیابت نوع دو مناسب نبوده و احتمالا افق درمانی مطلوبی برای بیماری‌هایی خواهد بود که در آنها القاء آپوپتوز سلولی یک مزیت به شمار می‌آید.

1- Intra-Islet
2-Insulinimmunopositivity
3-Insulin-Positive
4-S. Oleana Pericarp

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره دکتری رشته زیست جانوری گرایش فیزیولوژی با کد اخلاق IR.IAU.SRB.REC.1396.40 دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران می‌باشد، که با حمایت معنوی این دانشگاه انجام شد. نویسندگان از مرکز تحقیقات رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران که این پروژه در آنجا صورت گرفته و نیز دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم که بررسی های فیتوشیمیایی در آنجا انجام شده است، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

REFERENCES

1.Kahn SE, Cooper ME, Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: prespectives on the past, present and future. Lancet 2014; 383(9922):1068–83.
2.Cnop M, Welsh N, Jonas J-C, Jörns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of pancreatic β-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. Diabetes 2005; 54(2): S97–107.
3.Butler AE, Dhawan S. β-Cell Identity in Type 2 Diabetes: Lost or Found? Diabetes 2015; 64(8): 2698.
4.Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-Cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 2003; 52: 102–10.
5.Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. Diabetologia 2003; 46(1): 3–19.
6.Kaiser N, Leibowitz G NR. Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. J Pediatr Endocrinol Metab 2003; 16(1): 5–22.
7.Rhodes CJ. Type 2 Diabetes-a Matter of {beta}-Cell Life and Death? Science 2005; 307(5708): 380–4.
8.Moloudizargari M, Mikaili P, Aghajanshakeri S, Asghari MH, Shayegh J. Pharmacological and therapeutic effects of Peganum harmala and its main alkaloids. Pharmacogn Rev 2013; 7(14): 199–212.
9.Bahmani M, Rafieian-kopaei M, Parsaei DP, Mohsenzadegan A. The anti-leech effect of Peganum harmala L. extract and some anti-parasite drugs on Limnatis Nilotica. African Journal of Microbiology Research 2012; 2: 2586–90.
10.Hemmateenejad B, Abbaspour A, Maghami H, Miri R, Panjehshahin MR. Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in Peganum harmala seed extracts. Anal Chim Acta 2006; 575(2): 290–9.
11.Karam Sichani S. Naghsh Nooshin RN. Effects of alcoholic extract of peganumharmala l. on malondialdehyde concentration and catalaseand glutathione peroxidase activity in mice treated with nanosilver particles tt - [internet]. J-Mazand-Univ-Med-Sci 2012; 22: 10–7.
12.Monsef HR, Ghobadi A, Iranshahi M, Abdollahi M. Antinociceptive effects of Peganum harmala L. alkaloid extract on mouse formalin test. J Pharm Pharm Sci 2004; 7(1): 65–9.
13.Tahraoui A, El-Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). J Ethnopharmacol 2007; 110(1): 105–17.
14.Komeili G, Hashemi M, Bameri-Niafar M. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic effects of Peganum harmala seeds in diabetic rats. Cholesterol 2016; 2016: 1–6.
15.Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? Free Radic Biol Med 2004; 36(7): 838–49.
16.Li WG, Zhang XY, Wu YJ, Tian X. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. Acta Pharmacol Sin 2001; 22(12): 1117–20.
17.Lu Y, Zhao WZ, Chang Z, Chen WX, Li L. Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage. Acta Pharmacologica Sinica 2004; 25(8): 1083-9.
18.Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. Mutat Res Mol Mech Mutagen 2003; 523: 87–97.
19.Pinent M, Castell A, Baiges I, Montagut G, Arola L, Ardévol A. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. Compr Rev Food Sci Food Saf 2008; 7(4): 299–308.
20.Spencer JPE, Schroeter H, Rechner AR, Rice-Evans C. Bioavailability of Flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. Antioxid Redox Signal 2001; 3(6): 1023–39.
21.Fu Z, Zhang W, Zhen W, Lum H, Nadler J, Bassaganya-Riera J, et al. Genistein Induces pancreatic β-cell proliferation through activation of multiple signaling pathways and prevents insulin-deficient diabetes in mice. Endocrinology 2010; 151(7): 3026–37.
22.Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK, Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. J Agric Food Chem 2005; 53(1): 28–31.
23.Mai TT, Yamaguchi K, Yamanaka M, Lam NT, Otsuka Y, Chuyen N Van. Protective and anticataract effects of the aqueous extract of Cleistocalyx operculatus flower buds on beta-cells of streptozotocin-diabetic rats. J Agric Food Chem 2010; 58(7): 4162–8.

24.Esmaeili MA, Zohari F, Sadeghi H. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from Teucrium polium on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. Planta Med 2009; 75(13): 1418–20.
25.Kasetti RB, Rajasekhar MD, Kondeti VK, Fatima SS, Kumar EGT, Swapna S, et al. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of methanol:water (4:1) fraction isolated from aqueous extract of Syzygium alternifolium seeds in streptozotocin induced diabetic rats. Food Chem Toxicol 2010; 48(4): 1078–84.
26.Castell-Auví A, Cedó L, Pallarès V, Blay M, Pinent M, Ardévol A. Grape seed procyanidins improve β-cell functionality under lipotoxic conditions due to their lipid-lowering effect. J Nutr Biochem 2013; 24(6): 948–53.
27.Srikanta S, Ganda OP, Jackson RA, Gleason RE, Kaldany A, Garovoy MR, et al. Type I diabetes mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. Ann Intern Med 1983; 99(3): 320–6.
28.Guiot Y, Sempoux C, Moulin P, Rahier J. No decrease of the beta-cell mass in type 2 diabetic patients. Diabetes 2001; 50(suppl 1): S188.
29.Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 2003; 52(1): 102–10.
30.Donath MY, Halban PA. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. Diabetologia 2004; 47(3): 581–9.
31.Huang CS, Yin MC, Chiu LC. Antihyperglycemic and antioxidative potential of Psidium guajava fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol 2011; 49(9): 2189–95.
32.Hahm SW, Park J, Son YS. Opuntia humifusa stems lower blood glucose and cholesterol levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutr Res 2011; 31(6): 479–87.
33.Shori AB. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants. J Integr Med 2015; 13(5): 297–305.
34.Oberley LW. Free radicals and diabetes. Free Radic Biol Med 1988; 5(2): 113–24.
35.Patel JM. A review of potential health benefits of flavonoids. Lethbridge Undergraduate Research Journal 2008; 3(2): 1-5
36. Nejati V, Khaneshi F. Effect of hydro-alcoholic extract of Plantago major leaf on serum level of insulin, glucose, and histology of pancreas and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. Qom Univ Med Sci J 2013; 7(5): 14–20.
37.Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. Food Funct 2010; 1(1): 15–31.
38.Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. Diabetes 1999; 48(12): 2398-2406.
39.Bhandari U, Jain N, Pillai KK. Further studies on antioxidant potential and protection of pancreatic β-cells by Embelia ribes in Experimental diabetes. Exp Diabetes Res 2007; 2007: 1-6.
40.Gorąca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid–biological activity and therapeutic potential. Pharmacol Reports 2011; 63(4): 849–58.
41.Illison VK, Rondó PHC, de Oliveira AM, Campos KF. The relationship between plasma α-tocopherol concentration and vitamin E intake in patients with Type 2 diabetes mellitus. Int J Vitam Nutr Res 2011; 81(1): 12.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Leaf Extract *P. harmala* on Streptozotocin-Induced Apoptosis in Pancreatic Tissue of Rats

Safamanesh A[1], Aryan SH[1,2], Ahmadi R[3]*, Parivar K[1]

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Iran, [2]Departments of Animal Science, Kharazmi University, Tehran, Iran, [3]Departments of Animal Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

Received: 01 Sep 2020 Accepted: 02 Jan 2021

Abstract:

Background & aim: Decreased beta-cell mass has a role in the pathogenesis of human type 2 diabetes and in rodent diabetes models. The study of plant extracts is important as they possibly inhibit the reduction of beta cell mass and the islets of Langerhans. The aim of this study was to determine the effect of leaf extract of *P. harmala* on streptozotocin-induced apoptosis in rat pancreatic tissue.

Methods: In this experimental study that was conducted in 2016, a number of 32 male rats (250±10g) were acquired from the Pasteur Institute of Iran and randomly divided into four groups (n= 8), including control, diabetic, diabetic and experimental treated with *P. harmala* leaf extract. Diabetic groups were given 60 mg/kg streptozotocin. After confirming the induction of diabetes on the tenth day, methanolic leaf extract (150 mg/kg) was administered by gavage for 28 days for the groups treated with the extract. The extracted content of the *P. harmala* leaf was then analyzed by HPLC. Subsequently, rats' serum glucose level was assessed, and the pancreatic tissue was removed. Following H&E and AgNOR staining, the number of beta cells and the diameter of the islets were measured. Finally, the collected data were analyzed by SPSS software.

Results**:** the results showed that the *P. harmala* leaf extract is rich in flavonoid compounds. A significant difference was observed in the serum glucose concentrations on days 10, 14, and 28 between the diabetic and control groups ($p \leq 0.001$), but there was no meaningful difference between the diabetic group treated with the leaf extract and the diabetic group. The mean islet diameter reduced significantly in the diabetic group relative to the control group ($p \leq 0.01$), while the difference was insignificant between the diabetic group treated with the leaf extract and the diabetic group. Besides, the experimental groups under treatment did not show any meaningful difference with the control group.

Conclusion: In spite of the fact that the *P. harmala* leaf extract contains flavonoids and phenolic compounds, unlike previous studies, it could not improve the side effects of streptozotocin in the diabetic group.

Keywords: Flavonoid compounds, *P. harmala* Leaf Extraction, Diabetes, Apoptosis

***Corresponding author: Ahmadi R**, Departments of Animal Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
Email: ramahmd@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Safamanesh A, Aryan SH, Ahmadi R, Parivar K. The Effect of Leaf Extract *P. harmala* on Streptozotocin-Induced Apoptosis in Pancreatic Tissue of Rats. Armaghane-danesh 2021; 26(2): 148-164.