

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۴، دی ۱۳۹۴، ۸۷۸-۸۶۵

عصاره آبی گیاه چرخه (*Launaea acanthodes*) بر پارامترهای استرس اکسیداتیو گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی

راهله رهباریان^۱، حشمت سپهری مقدم^۲، سید دامون صدوقی^۳

دریافت مقاله: ۹۳/۱۲/۱۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۴/۴/۳۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۴/۷/۱۱ پذیرش مقاله: ۹۴/۸/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: افزایش مقاومت انسولین، فاکتورهای التهابی و پارامترهای استرس اکسیداتیو با پیشرفت دیابت مرتبط است. گیاه چرخه دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و اثرات هیپوگلیسمیک است. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره گیاه آبی چرخه بر سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳۶ سر موش صحرایی به گروه‌های مساوی شاهد، شاهد دیابتی و تجربی دیابتی ۱ و ۲ تقسیم شدند. گروه‌های شاهد دیابتی و تجربی دیابتی، با یک بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان دیابتی شدند. گروه‌های تجربی دیابتی یک روز در میان و به مدت یک ماه، عصاره آبی گیاه چرخه را به صورت داخل صفاقی و با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند. به گروه‌های شاهد و شاهد دیابتی آب مقطر استریل تزریق شد. در هر یک از روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ پس از القاء دیابت تجربی سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون S-ترانسفراز (GST) و کاتالاز (CAT) همچنین، میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در گلبول‌های قرمز اندازه‌گیری شد. داده‌ها بر اساس آزمون واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی TUKEY تحلیل شدند.

یافته‌ها: افزایش معنی‌دار در میزان MDA و کاهش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، GST و CAT نمونه‌های دیابتی مشاهده شد ($p < 0/05$). تزریق عصاره گیاه چرخه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های دیابتی منجر به کاهش معنی‌دار در MDA و افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های SOD، GST و CAT گلبول‌های قرمز شد ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه تأییدکننده نقش آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت عصاره گیاه چرخه در بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، گیاه چرخه، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، گلبول‌های قرمز، موش صحرایی

۱- استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- استادیار گروه آموزشی کشاورزی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳- (نویسنده مسئول) دانشجوی دکتری تخصصی بیولوژی سلولی تکوین، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تلفن: ۰۵۱-۳۸۶۸۳۰۰۱، دورنگار: ۰۵۱-۳۸۶۸۳۰۰۱، پست الکترونیکی: Damoon.sadughi@gmail.com

مقدمه

بیماری دیابت مجموعه‌ای از اختلالات پیچیده در متابولیسم پروتئین، چربی و کربوهیدرات‌ها می‌باشد که در اثر کمبود یا کاهش نسبی انسولین و یا کاهش حساسیت بافت‌ها نسبت به انسولین ایجاد می‌شود. دیابت موجب استرس اکسیداتیو، عوارض متابولیکی حاد نظیر کتواسیدوز، اختلالات قلبی عروقی و عوارض مزمن نامطلوب نظیر ضایعات پوستی رتینوپاتی، نوروپاتی، نوروپاتی می‌شود [۱].

افزایش گلوکز خون به نوبه خود، شروع یک سری از واکنش‌های آبشاری را القاء می‌کند که در نهایت منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال آزاد اکسیژن در خون و بافت‌های گوناگون بدن می‌شود [۲]. این ترکیبات به علت داشتن قدرت واکنش شیمیایی بالا موجب صدمات سلولی و بافتی می‌شوند.

گزارشات متعددی مبنی بر دخالت گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive Oxygen Species: ROS) در ایجاد صدمات سلولی و بافتی منتشر شده است [۳]. سلول‌ها درمقابل رادیکال‌های آزاد بویژه ROS توسط چندین ترکیب آنتی‌اکسیدانی از جمله گلوتاتیون، ویتامین E، ویتامین C و آنزیم‌هایی مانند گلوتاتیون S- ترانسفراز (GST: Glutathione S-transferase)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD: Superoxide dismutase)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX: Glutathione peroxidase) و کاتالاز (CAT: Catalase) محافظت می‌شوند. از طرف دیگر مطالعات انجام یافته حاکی از کاهش معنی‌دار مقدار

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در خون و سلول‌های موش‌های دیابتی می‌باشد از این رو استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بویژه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای جلوگیری از صدمات اکسیداتیو در بیماران دیابتی با شرایط استرس اکسیداتیو بالا می‌تواند سودمند باشد [۴].

استرس اکسیداتیو عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن می‌باشد و با دیابت و عوارض ناشی از آن رابطه مستقیم دارد. نشان داده شده است طی هر دو نوع دیابت ۱ و ۲، استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد. دیابت وابسته به انسولین، هیپرگلیسمی مزمن با افزایش تولید پراکسید هیدروژن و کتوآلدئیدها از طریق اکسیداسیون خود به خودی گلوکز باعث صدمه به سلول‌ها می‌شود. رادیکال‌های آزاد به طور کنترل نشده‌ای در بیماران دیابتی به وسیله اکسیداسیون گلوکز، گلیکاسیون غیر آنزیماتیک پروتئین‌ها و به دنبال آن تخریب اکسیداتیو پروتئین‌های گلیکوله ایجاد می‌شود [۵]. افزایش سطوح رادیکال‌های آزاد و کاهش همزمان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بدن می‌تواند منجر به صدمه بافت‌ها و آنزیم‌ها شده همچنین پراکسیداسیون لیپیدی و مقاومت به انسولین را افزایش دهد [۶]. همچنین، مشخص شده است لیپیدها از مهم‌ترین مولکول‌هایی هستند که مورد تهاجم رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند. وقتی اسیدهای چرب غیر اشباع تحت تاثیر رادیکال‌های آزاد قرار گیرند، یکسری واکنش‌های زنجیره‌ای منجر به تشکیل لیپیدهای الکترون دوست و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود. در اثر پراکسیداسیون لیپیدی مالون‌دی‌آلدئید (MDA: Malondialdehyde) که یکی از سمی‌ترین انواع آلدئید

است ایجاد و منجر به آسیب‌های سلولی و بافتی می‌شود. یکی از شاخص‌های بررسی استرس اکسیداتیو مالون‌دی‌آلدئید است و میزان آسیب‌پذیری لیپیدهای سلول در برابر اکسیداسیون و رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد [۷].

در این پژوهش با استفاده از ماده شیمیایی آلوکسان مونوهیدرات شرایطی مشابه با دیابت نوع ۱ ایجاد شد. طبق تحقیقات انجام شده آلوکسان به صورت انتخابی از طریق القای آپوپتوزیس، سلول‌های بتای پانکراس را تخریب و با توقف و یا کاهش ترشح انسولین موجب بروز هیپرگلیسمی می‌شود. آلوکسان باعث مهار آنزیم پروتئین کیناز C سلول‌های بتای پانکراس می‌شود که علت آن کاهش دی‌اسیل‌گلیسرول می‌باشد. با کاهش میزان دی‌اسیل‌گلیسرول آنزیم پروتئین کیناز A فعال و تحمل سلول نسبت به افزایش کلسیم داخل سلولی کاهش می‌یابد بنابراین شرایط برای القاء آپوپتوز مساعد می‌شود. مسیر دیگری که در توجیه آپوپتوز به دنبال تجویز آلوکسان نقش دارد فعال شدن مسیر استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد که محصول نهائی آن تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و تخریب سلول‌های بتای پانکراس است [۸].

با توجه به مطالب ذکر شده استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در کاهش عواقب ناشی از بیماری دیابت خواهند داشت و در این بین استفاده از ترکیبات با منشا گیاهی که معمولاً با عوارض جانبی کمتری همراه هستند، اهمیت خاص خود را دارد [۹]. گزارش شده است ترکیبات موجود در گیاهان دارویی می‌توانند با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های GPX،

CAT و SOD نقش محافظتی در برابر شرایط استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی ناشی از دیابت داشته باشند. از آنجا که تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی یکی از عوارض بیماری دیابت می‌باشد، می‌توان با تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در افراد دیابتی تا حدودی از پیشرفت بیماری جلوگیری کرد [۱۰]. آنتی‌اکسیدان‌ها مواد بیوشیمیایی مهمی هستند که DNA را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند. مشخص شده است گیاهان دارویی با دارا بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند با کاهش رادیکال‌های آزاد ناشی از دیابت موجب بهبود آسیب‌های وارده به سلول‌ها شوند [۱۱].

گیاه چرخه از خانواده Asteraceae با نام علمی *Launaea acanthodes* که به نام‌های چرخان، چرخک یا شکر لوله شناخته می‌شود. چرخه گیاهی است چند ساله، بوته‌ای و بیابانی با شاخک‌های انبوه، ساقه‌ای بدون کرک، منشعب و شیرابه‌ای سفید رنگ که در اثر ماندن حالت شیشه‌ای و رنگ زرد پیدا می‌کند. این گیاه با نام بومی مقل و ملک ازرق در نقاط خشک و بیابانی ایران از جمله استان‌های مرکزی، نظیر یزد، اصفهان، سمنان، تهران، قم، کرمان و خراسان می‌روید. ساقه این گیاه در بین اهالی مناطق کویری به عنوان یک داروی گیاهی مؤثر در درمان بسیاری از بیماری‌ها نظیر صرع، ناراحتی عصبی، دردهای موضعی و مفصلی، اختلالات معده‌ای روده‌ای، دیابت و کاهش قند خون استفاده می‌شود [۱۲]. در عصاره این گیاه ترکیباتی از قبیل فلاونوئید، ترپنوئید، ساپونین، آلکالوئید، تانن، پلی‌ساکارید و منوساکاریدهایی نظیر آرابینوز، مانوز و مشتقات اسید گلوکورونیک نیز شناسایی

شده است [۱۳]. از عصاره ساقه گیاه چرخه ترکیبات فلاونوئیدی تخلیص شده است [۱۴]. با توجه به این که فلاونوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان قادر به کاهش سطح رادیکال‌های آزاد سلولی هستند می‌توان از آنها در کاهش اثرات مخرب دیابت استفاده نمود. همچنین، گزارش شده است تجویز عصاره آبی-الکلی گیاه چرخه در کاهش قند خون و برگشت حیوانات به شرایط یوگلیسمیک مؤثر است و نیز اثرات هیپوگلیسمیک عصاره گیاه چرخه احتمالاً ناشی از تحریک سنتز و ترشح انسولین و یا هیپرپلازی سلول‌های بتای پانکراس می‌باشد و اثرات مشاهده شده ممکن است به خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی آن مربوط باشد [۱۵]. همچنین، مشخص شده است عصاره گیاه چرخه موجب بهبود عملکرد کبد با جلوگیری نسبی از افزایش پیشرونده سطح شاخص‌های کبدی ALT, AST, ALP در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۶]. در مطالعه دیگری مشخص شد عصاره گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰ mg/kg می‌تواند با تأثیر بر بافت بیضه موجب کاهش آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز در موش‌های صحرایی دیابتی شود و با بهبود پارامترهای اسپرمی و افزایش تعداد اسپرم منجر به کاهش عوارض ناشی از دیابت در اسپرم و بافت بیضه شود [۱۷]. همچنین، مشخص شد تجویز عصاره آبی گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰ mg/kg به موش‌های صحرایی دیابتی می‌تواند از طریق افزایش در تعداد و حجم جزایر لانگرهانس که احتمالاً در نتیجه هیپرتروفی و هیپرپلازی سلول‌های بتا است، موجب افزایش ترشح انسولین شود [۱۸].

با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای بر روی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گیاه چرخه بر گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی صورت نگرفته است، این پژوهش با هدف یافتن اثر عصاره آبی گیاه چرخه بر پارامترهای استرس اکسیداتیو گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه تحقیقاتی جانوری گروه زیست‌شناسی و کشاورزی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد در سال ۱۳۹۳ انجام شد.

اندام هوایی (ساقه و برگ) گیاه چرخه در حدفاصل جاده مشهد به نیشابور جمع‌آوری شد. نمونه‌های گیاهی پس از جمع‌آوری، توسط هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه پیام نور شناسایی و تأیید شد.

گیاه چرخه پس از طی مراحل خشک شدن در سایه در دمای 36 ± 3 درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب خرد شد. عصاره آبی گیاه چرخه با استفاده از دستگاه سوکسله تهیه شد. ابتدا ۵۰ گرم پودر خشک شده گیاه چرخه داخل کاغذ کارتوش (Cartuosh) ریخته و در دستگاه قرار داده شد سپس ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان حلال در داخل بالن دستگاه ریخته شد. آب مقطر توسط گرم‌کن دستگاه به جوش می‌آید و در نهایت موجب جداسازی عصاره گیاه چرخه می‌شود. مبرد، کار سرد کردن بخارات اضافی را بر عهده دارد بنابراین کاهش حجم محلول بسیار آهسته می‌باشد. پس از حدود ۱۰ ساعت مایع نسبتاً

شوک حاصل از تزریق انجام گرفت. گروه شاهد دیابتی پس از ایجاد دیابت تجربی به مدت یک ماه به صورت یک روز درمیان به روش داخل صفاقی آب مقطر استریل دریافت نمودند. گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پس از ایجاد دیابت تجربی به مدت یک ماه به صورت یک روز درمیان عصاره آبی گیاه چرخه را به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند [۱۷-۱۸].

مدل تجربی دیابت (دیابت وابسته به انسولین) در موش صحرایی با یک بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات (Sigma-Aldrich, Germany) به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایجاد گردید. همچنین، از بافر سیترات به عنوان حلال آلوکسان استفاده شد. تزریق آلوکسان به گروه شاهد دیابتی و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره صورت گرفت. به دلیل این که مطالعه بر روی دیابت مزمن می‌باشد، حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان و القاء دیابت تجربی جهت تأیید آن خون‌گیری از ورید دمی صورت گرفت و قند خون توسط دستگاه گلوکومتر (EasyGluco, Korea) اندازه‌گیری و قندخون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد [۱۷-۱۸].

در هر یک از روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ آزمایش به دنبال ۱۲ ساعت ناشتایی، ۳ سر موش از هر گروه با دی‌اتیل‌اتر (MERCK, Germany) بی‌هوش شد. سپس پوست ناحیه قفسه سینه، جناغ و دنده‌ها برش داده شد و با کنار کشیدن جناغ و دنده‌ها از بطن چپ قلب توسط سرنگ ۲ میلی‌لیتر خون‌گیری انجام شد. خون گرفته شده بدون ماده ضد

غلظتی در ته بالن جمع شد. سپس با حذف حلال در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره تام استخراج شد. پس از حذف حلال عصاره با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به موش‌های صحرایی دیابتی تزریق شد. محلول تهیه شده از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده و استریل شد [۱۷-۱۹].

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نژاد Wistar با سن تقریبی ۶-۷ هفته و با وزن تقریبی 16 ± 148 گرم استفاده شد. حیوانات در دمای تقریبی ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۰-۳۵٪ و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات در قفس‌های استاندارد قرار داشتند و آب به مقدار کافی توسط بطری شیشه‌ای در اختیار آنها قرار داده شد و از غذای مخصوص موش (غذای فشرده) تغذیه نمودند. به منظور حصول حالت سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات به انجام رسید. رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد. همچنین، در کلیه مراحل، قوانین و مقررات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است [۱۷-۱۸].

تعداد ۳۶ سر موش صحرایی نر به طور تصادفی به چهار گروه ۹ تایی تقسیم شدند. شامل گروه سالم، گروه شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره گیاه چرخه. نمونه‌های گروه شاهد سالم به مدت یک ماه به صورت یک روز درمیان به روش داخل صفاقی آب مقطر استریل دریافت نمودند این عمل به منظور یکسان نمودن

انعقاد درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱۲ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از وقوع انعقاد لوله‌ها در دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۱۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس سرم خون روی بخش لخته شده توسط پیپت پاستور جدا و به لوله آزمایش دیگری منتقل شد. سپس درب آنها توسط پارافیلیم مسدود و جهت سنجش سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، GST و CAT همچنین میزان MDA در گلوبول‌های قرمز به آزمایشگاه تشخیص طبی منتقل شد [۱۷-۱۸].

اطلاعات بدست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۰ تحلیل شد. تحلیل داده‌ها بر اساس آزمون واریانس دوطرفه (Two way repeated measures anova) و آزمون تعقیبی TUKEY انجام شد. همچنین اثر متقابل غلظت عصاره تزریقی و زمان (Interaction) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

بر اساس نتایج بدست آمده میزان MDA در نمونه‌های گروه شاهد دیابتی در هر یک از روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ آزمایش در مقایسه با نمونه‌های گروه سالم به طور معنی‌داری افزایش یافت $p=0/007$ ، $p=0/004$ و $p=0/001$. همچنین، تجویز عصاره گیاه چرخه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی دیابتی

توانست میزان MDA را در هر یک از روزهای ۱۵ و ۳۰ آزمایش در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد دیابتی به طور معنی‌داری کاهش دهد. غلظت ۱۰۰ شامل $p=0/019$ و $p=0/011$ ، غلظت ۳۰۰ شامل $p=0/008$ و $p=0/001$ (جدول ۱ و ۲).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAL و GST در روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ آزمایش در نمونه‌های گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه سالم به طور معنی‌داری کاهش یافت. روز ۱ شامل $p=0/005$ ، $p=0/009$ ، $p=0/001$ ، روز ۱۵ شامل $p=0/001$ ، $p=0/018$ ، $p=0/021$ و روز ۳۰ شامل $p=0/001$ ، $p=0/017$ ، $p=0/025$. عدد p بدست آمده از مقایسه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAL و GST نمونه‌های دیابتی دریافت کننده عصاره آبی گیاه چرخه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه شاهد دیابتی در روز ۱ شامل $p=0/061$ ، $p=0/062$ ، $p=0/068$ ، روز ۱۵ شامل $p=0/055$ ، $p=0/065$ ، $p=0/068$ و در روز ۳۰ شامل $p=0/003$ ، $p=0/007$ ، $p=0/011$. عدد p بدست آمده از مقایسه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAL و GST نمونه‌های دیابتی دریافت کننده عصاره آبی گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه شاهد دیابتی در روز ۱ شامل $p=0/071$ ، $p=0/085$ ، $p=0/079$ ، روز ۱۵ شامل $p=0/005$ ، $p=0/011$ و روز ۳۰ شامل $p=0/001$ ، $p=0/006$ ، $p=0/01$ (جدول ۱ و ۲).

جدول ۱- میانگین سطح MDA، SOD، CAT و GST گلبول‌های قرمز در هر یک از روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ به تفکیک گروه

گروه	سالم			شاهد دیابتی			دیابتی تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چرخه			دیابتی تیمار با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره چرخه		
	۳۰	۱۵	۱	۳۰	۱۵	۱	۳۰	۱۵	۱	۳۰	۱۵	۱
MDA nmol /mg	۲/۴۶±۰/۹۰	۲/۶۷±۰/۵۲	۸/۲۰±۲/۰۸	۸/۷۸±۱/۹۳	۱۰/۱۴±۳/۵۴	۸/۱۹±۲/۵۴	۵/۶±۲/۳۸	۴/۶۲±۰/۲۵	۷/۳۴±۲/۱۸	۴/۰۴±۱/۶۹	۳/۷۱±۰/۴۲	۲/۸۳±۰/۶۱
SOD nmol /mg	۶/۱۷±۱/۸۲	۶/۱۶±۲/۰۳	۰/۹۸±۰/۲۱	۰/۷۵±۰/۳۵	۰/۶۰±۰/۱۴	۰/۸۲±۰/۱۱	۱/۳۸±۰/۲۸	۱/۹۷±۰/۳۸	۰/۷۰±۰/۰۹	۱/۸۲±۰/۶۲	۲/۴۴±۰/۹۲	۴/۵۰±۲/۲۸
CAT nmol /mg	۳/۹۰±۱/۳۵	۳/۹۷±۲/۱۱	۰/۸۵±۰/۱۱	۰/۶۹±۰/۲۸	۰/۳۵±۰/۲۱	۰/۶۵±۰/۱۸	۱/۱۸±۰/۳۱	۱/۵۷±۰/۱۳	۰/۸۰±۰/۰۳	۱/۷۵±۰/۴۴	۲/۰۸±۰/۸۱	۳/۸۸±۲/۲۰
GST nmol /mg	۳/۶۸±۲/۵۶	۳/۶۷±۲/۳۸	۰/۶۰±۰/۱۵	۰/۵۲±۰/۲۰	۰/۳۷±۰/۰۸	۰/۴۲±۰/۰۷	۰/۹۸±۰/۲۰	۱/۳۱±۰/۵۱	۰/۴۳±۰/۱۴	۱/۳۷±۰/۲۱	۱/۶۸±۰/۳۵	۴/۷۴±۱/۶۱

نتایج به صورت (Mean ± SEM (Standard Error of Mean نشان داده شده است.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت عصاره تزریق شده، زمان و اثر متقابل غلظت- زمان بر پارامترهای *GST* و *CAT*، *SOD* و *MDA*

متغییر	میانگین مربعات				مقدار p			
	<i>GST</i>	<i>CAT</i>	<i>SOD</i>	<i>MDA</i>	<i>GST</i>	<i>CAT</i>	<i>SOD</i>	<i>MDA</i>
اثر غلظت	۴۱/۷۹**	۳/۲۱*	۲/۲۲*	۹/۳۲**	۰/۰۰۹	۰/۰۲۶	۰/۰۱۹	۰/۰۰۲
اثر زمان	۲۴۰/۹۲**	۷۲/۸۷**	۶۳/۱۴**	۱۳۶/۵۴**	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
اثر متقابل غلظت- زمان	۶۳/۴۱**	۴/۶۹*	۳/۲۰*	۳/۹۸*	۰/۰۱۴	۰/۰۲۱	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱

** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح $p < 0.01$ و $p < 0.05$ را نشان می‌دهد

بحث

در این مطالعه مشخص شد تجویز عصاره آبی گیاه چرخه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی دیابتی به مدت ۳۰ روز به صورت یک روز درمیان موجب بهبود سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی *SOD*، *GST*، *CAT* و میزان *MDA* گلوبول‌های قرمز در مقایسه با نمونه‌های دیابتی شد. سطح سرمی *MDA* در موش‌های دیابتی در مقایسه با موش‌های سالم به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی *SOD*، *GST* و *CAT* در موش‌های دیابتی در مقایسه با موش‌های سالم به طور معنی‌داری کاهش یافت.

تحقیقات نشان می‌دهد دیابت موجب افزایش شرایط استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود همچنین مشخص شده است بین عوارض دیابت و پراکسیداسیون لیپیدی ارتباط وجود دارد؛ چنانکه افزایش قند خون باعث کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌های محافظت کننده آندوژن و افزایش رادیکال‌های آزاد می‌شود [۲۰]. با توجه به اینکه استرس اکسیداتیو به دلیل تشدید تشکیل

رادیکال‌های آزاد است و این مواد به دنبال کامل کردن مدار الکترونی خود هستند، مواد تشکیل دهنده سلول از جمله ساختارهای پروتئینی و لیپیدی آسیب می‌بینند که این با کاهش سطح آنزیم‌های *SOD*، *GST* و *CAT* در خون و بافت خود را نشان می‌دهد. همچنین، مطالعات مختلف نشان داده‌اند افزایش قند خون ناشی از دیابت یکی از علل اصلی افزایش استرس اکسیداتیو است [۲۲-۲۱]. نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که در حالت دیابت قندی شامل نوع ۱ و ۲ استرس اکسیداتیو به علت ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد و سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانتی تضعیف می‌شود [۲۳] و این نتایج تا حدودی در بررسی حاضر نیز به دست آمده است. القاء آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یک رویکرد مهم برای حفاظت سلول‌ها در مقابل انواع مختلف ترکیبات سمی درونی و بیرونی از قبیل رادیکال‌های آزاد محسوب می‌شود و دیابت القاء شده با آلوکسان با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آندوژن می‌تواند موجب تشدید استرس اکسیداتیو شود [۲۴].

سلول‌های پانکراس به ویژه سلول‌های جزایر لانگرهانس در مقابل استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی جلوگیری کند. همچنین مشخص شده است آنتی‌اکسیدان‌های گیاهان می‌تواند عملکرد پانکراس را طی دیابت بهبود بخشد و عملکرد سلول‌های را افزایش دهد [۲۹]. با توجه به نتایج این پژوهش بخش دیگر از اثرات سودمند عصاره چرخه را می‌توان به اثر هیپوگلیسمیک آن نسبت داد. احتمالاً از طریق کاهش دادن سطح محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون می‌تواند موجب کاهش استرس اکسیداتیو و در نهایت کاهش سطح MDA و افزایش آنتی‌اکسیدان‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، GST و CAT در موش‌های دیابتی شود [۳۰].

گزارش شده است عصاره هیدروالکلی گیاه چرخه می‌تواند موجب کاهش سطح سرمی قند خون در اثر افزایش سطح سرمی انسولین شود همچنین، مشخص شده است این اثرات ناشی از هیپرتروفی سلول‌های بتای باقی مانده در پانکراس و در نتیجه افزایش ترشح انسولین است [۱۵]. این اثرات عصاره را می‌توان به حضور آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند فلاونوئید و ترکیبات آلکالوئیدی و ترپنوئیدی نسبت داد. همچنین، مشخص شده است تجویز عصاره گیاه چرخه علاوه بر اصلاح نسبی اختلالات متابولیکی ناشی از هیپرگلیسمی و کاهش سطح سرمی گلوکز خون، می‌تواند با جبران نقایص عملکردی کلیه، از دفع آلبومین ادرار جلوگیری نماید [۱۲]. در مطالعه دیگری مشخص شد فلاونوئیدها دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بوده و می‌توانند موجب کاهش قند خون شوند. با توجه به اینکه گیاه چرخه دارای ترکیبات فلاونوئیدی است بنابراین

کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، GST و CAT در گلبول‌های قرمز موش‌های دیابتی که در این پژوهش مشاهده شد ممکن است به علت افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که این نتایج با تحقیقات انجام شده مطابقت دارد [۲۶-۲۵]. در این پژوهش مشخص شد با گذشت زمان در نمونه‌های دیابتی میزان MDA افزایش می‌یابد که این می‌تواند نشان دهنده افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو باشد. با توجه به این که استرس اکسیداتیو به علت تشدید تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌باشد و این مواد به دنبال کامل نمودن مدار الکترونی خود می‌باشند؛ مواد تشکیل دهنده سلول از جمله ساختارهای پروتئینی و لیپیدی آسیب می‌بینند که این منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، GST و CAL در موش‌های دیابتی می‌شود [۲۷].

در این پژوهش تجویز تزریقی عصاره آبی گیاه چرخه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش سطح شاخص‌های استرس اکسیداتیو در گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی شد. بخشی از اثرات سودمند عصاره چرخه را می‌توان به اثر کاهش دهندگی شرایط استرس اکسیداتیو ترکیبات گیاه چرخه به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و تقویت کنندگی سیستم حذف رادیکال‌های آزاد نسبت داد [۱۴]. مشخص شده است برخی ترکیبات گیاهی می‌توانند موجب افزایش آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی و تشدید فعالیت آنها در بیماران دیابتی شوند [۲۸]. محققین نشان داده‌اند ترکیبات موجود در گیاهان دارویی می‌تواند از تخریب

پیرامون شناخت دقیق مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مؤثر در عملکرد فارماکولوژیکی عصاره چرخه در کنترل دیابت و استرس اکسیداتیو لازم است، تا اطلاعات در زمینه اثرات بالقوه آن کامل‌تر شود. محدودیت‌های این مطالعه شامل عدم بررسی‌های سلولی و مولکولی در مورد نتایج بدست آمده و عدم امکانات لازم جهت بررسی مکانیسم دقیق ترکیبات عصاره گیاه چرخه در بهبود شرایط استرس اکسیداتیو می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد عصاره آبی گیاه چرخه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت وابسته به دوز موجب بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. همچنین با توجه به نتایج بررسی حاضر می‌توان گفت عصاره آبی گیاه چرخه به عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان می‌تواند در کاهش آسیب‌های ناشی از استرس‌های اکسیداتیو نقش داشته باشد.

می‌توان اثرات آنتی‌اکسیدانی آن را به ترکیبات فلاونوئیدی نسبت داد [۳۱]. به نظر می‌رسد که عصاره‌ی گیاه چرخه به دلیل داشتن ترکیبات فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند علاوه بر اصلاح نسبی اختلالات متابولیکی ناشی از افزایش گلوکز خون، با جبران نقایص عملکردی پانکراس و افزایش ترشح انسولین، موجب کاهش سطح سرمی گلوکز خون شود. گزارش شده است عصاره گیاه چرخه، احتمالاً به دلیل محتوای فلاونوئیدی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند منجر به کاهش سطح سرمی گلوکز خون و از افزایش پیشرونده سطوح آنزیم‌های کبدی جلوگیری کند [۱۶].

با توجه به نقش گسترده آنتی‌اکسیدان‌ها به خصوص در بیماران دیابتی پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری بر روی خواص آنتی‌اکسیدانی گیاه چرخه و نقش آن در کنترل عوارض دیابت در حجم نمونه وسیع‌تر صورت گیرد. می‌توان با آنالیز بیوشیمیایی عصاره گیاه چرخه، اثر ترکیبات آن را بر پارامترهای استرس اکسیداتیو در بیماران دیابتی مورد بررسی قرار داد. همچنین مطالعات تکمیلی و گسترده‌تری

References

- [1] Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 2006; 22: 257-73.
- [2] Davi G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus, *Antioxid. Redox Signal* 2005; 7(1-2): 256-68.

- [3] Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur. J. of Pharmacology* 2010; 636(1-3): 8-17.
- [4] Shrilatha B, Muralidhara. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin diabetic rat. *Int. J. Androl* 2007; 30(6): 508-18.
- [5] Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(11): 1773-82.
- [6] Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2014; 1840(9): 2709-29.
- [7] Saburi S, Mohtadinia J, Ali-Asgarzadeh A, Nomi-Gholzar S, Yusefirad E. The relationship between serum level of chromium and serum malondialdehyde in patients with type II diabetes. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2010; 12(2): 1-6.
- [8] Hye-won R, Ji-Na L, Hyung-Rhokim M. Protective mechanism of glucose against alloxan-induced B-cell damage. *Exp Mol Med* 2000; 32(1): 12-7.
- [9] Joanna Harasym, Remigiusz Oledzki. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. *Nutrition* 2014; 30(5): 511-17.
- [10] Vadim Demidchik. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 2015; 109: 212-28.
- [11] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006; 160(1): 1-40.
- [12] Hajinejad Boshroue R, Behnam-Rassouli M, Tehranipour M, Gheybi F, Hajinejad Sh, Elahi Moghaddam Z. The Effects of Hydro- alcoholic extract of *Launaea acanthodes* on the Blood, Urine Albumin and Bilirubin Levels in Male Hyperglycemic Wistar Rat. *IJEM* 2013; 15(2): 190-233. [Farsi]
- [13] Piazza L, Bertini S, Milany J. Extraction and structural characterization of the polysaccharide fraction of *Launaea acanthodes* gum. *Carbohydrate Polymers* 2010; 79(2): 449-54.
- [14] Karimidokht shahrbabaki A, Oryan SH, Parivar K. Anticonvulsant activity of ethanolic extract and aqueous fraction of *Launaea acanthodes* gum in comparison with diazepam in mice. *JQUMS* 2009; 13(1): 14-20. [Farsi]
- [15] Behnam-Rassouli M, Ghayour N, Ghayour MB, Ejtehadi MM. Investigating the effects of hydroalcoholic extract of *Launaea acanthodes* on the serum levels of glucose, insulin, lipids and

- lipoproteins in streptozotocin induced type I diabetic rats. *AMUJ* 2011; 14(6): 48-56. [Farsi]
- [16] Jalali M, Behnam Rassouli M, Tehranipour M, Ghayour N, Khayatzaheh J, Jannati H. Study of the effects of hyperglycemia and *Launaea acanthodes* extract administration on disorders of liver function in rats. *Physiology and Pharmacology* 2012; 15(4): 562-71. [Farsi]
- [17] Rahbarian R, Sepehri Moghadam H, Sadoughi SD. Effect of Aqueous Extract of *Launaea acanthodes* on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Quarterly of the Horizon of Medical Sciences*. 2015; 21(1): 21-9.
- [18] Sepehri-Moghadam H, Rahbarian R, Sadoughi SD. The effect of aqueous extract of *Launaea acanthodes* (Boiss.) O. Kuntze on the serum level of insulin and blood glucose and histomorphological changes of pancreas in diabetic rats. *Feyz* 2015; 19(1): 30-7.
- [19] Rahbarian R, Sadooghi SD. Investigating the effects of aqueous extract of *asafoetida* resin on the serum level of insulin and blood glucose in type 1 diabetic rats. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2014; 16(3): 16-21. [Farsi]
- [20] Santilli F, Lapenna D, La Barba S, Davi G. Oxidative stress-related mechanisms affecting response to aspirin in diabetes mellitus. *Free Radical Biology & Medicine* 2015; 80: 101-10.
- [21] Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, et al. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 2010; 7(1): 15-25.
- [22] Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci* 2009; 85(23-26): 830-4.
- [23] Chang YC, Chuang LM. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes: from molecular mechanism to clinical implication. *Am J Transl Res* 2010; 2(3): 316-31.
- [24] Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 2011; 50(5): 567-75.
- [25] Cohen G, Riahi Y, Sunda V, Deplano S, Chatgililoglu C, Ferreri C, et al. Signaling properties of 4 hydroxyalkenals formed by lipid peroxidation in diabetes. *Free Radical Biology and Medicine* 2013; 65: 978-87.
- [26] Murdolo G, Piroddi M, Luchetti F, Tortoioli C, Canonico B, Zerbinati C, et al. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. *Biochimie* 2013; 95(3): 585-94.
- [27] Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maidi I. The Investigation of the Oxidative Stress-Related

- Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes* 2015; 39(1): 44-9.
- [28] Rong-zhen ZHONG, Dao-wei ZHOU. Oxidative Stress and Role of Natural Plant Derived Antioxidants in Animal Reproduction. *Journal of Integrative Agriculture* 2013; 12(10): 1826-38.
- [29] Pi J, Zhang Q, Fu J, Woods CG, Hou Y, Barbara E. et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010; 244(1): 77-83.
- [30] Fanaei H, Azizi Y, Khayat S. A Review: Role of oxidative stress in male infertility. *JFUMS* 2013; 3(2): 93-103.
- [31] Luka ínová A, Mojžiš J, Be a ka R, Keller J, Maguth T, Kurila P, et al. Preventive Effects of Flavonoids on Alloxan-Induced Diabetes Mellitus in Rats. *Acta Vet Brno* 2008; 77: 175-82.

The Effects of Aqueous Extract of *Launaea Acanthodes* on Oxidative Stress Parameters of Red Blood Cells in Diabetic Rats

R. Rahbarian¹, H. Sepehri-Moghadam², S.D. Sadoughi³

Received: 01/02/2015 Sent for Revision: 21/07/2015 Received Revised Manuscript: 03/10/2015 Accepted: 02/11/2015

Background and Objective: Increased insulin resistance, inflammatory factors and oxidative stress parameters are associated with the development of diabetes complications. *Launaea acanthodes* contains antioxidant compounds and has hypoglycemic effects. The aim of this study was to evaluate the effects of *Launaea acanthodes* aqueous extract on antioxidant enzymes level of red blood cells in diabetic rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 36 rats were divided into the equal groups of control, diabetes control and experimental diabetic 1 and 2. Experimental diabetic and diabetic control groups were got diabetic by an intraperitoneal injection of alloxan. Experimental diabetic groups received the aqueous extract of *Launaea acanthodes* (100 and 300 mg/kg, ip) on alternate days for one month. Sterile distilled water was injected to control and diabetic control groups. On 1st, 15th and 30th days after induction of experimental diabetes, levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione s-transferase (GST), catalase (CAT) antioxidant enzymes and malondialdehyde (MDA) level were measured in red blood cells. Data were analyzed by two-way repeated measures ANOVA and post hoc TUKEY test.

Results: Significant increase in MDA levels and significant decrease in SOD, GST and CAT enzymes were observed in diabetic rats ($p < 0.05$). Injection of *Launaea acanthodes* extract (100 and 300 mg/kg, ip) to the diabetic rats, resulted significant decrease in MDA levels and significant increase in SOD, GST, CAT activity enzymes in red blood cells ($p < 0.05$).

Conclusion: The results of this study confirm the dose-dependent antioxidant role of *Launaea acanthodes* extract on improving the oxidative stress in red blood cells from diabetic rats.

Key words: Diabetes, *Launaea acanthodes*, Antioxidant enzymes, Red blood cells, Rat

Funding: This research was funded by Payam-e-Noor University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Payam-e-Noor University of Mashhad approved the study.

How to cite this article: Rahbarian R, Sepehri-Moghadam H, Sadoughi SD. The Effects of Aqueous Extract of *Launaea Acanthodes* on Oxidative Stress Parameters of Red Blood Cells in Diabetic Rats. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2016; 14(10): 865-78. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

2- Assistant Prof., Dept. of Agriculture, Faculty of Sciences, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

3- PhD Student in Developmental Biology, Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

(Corresponding Author) Tel: (051) 38683001, Fax: (051) 38683001, E-mail: Damoon.sadoughi@gmail.com