



Study of the effects of hyperglycemia and *Launaea acanthodes* extract administration on disorders of liver function in rats

Mitra Jalali¹, Morteza Behnam Rassouli^{2*}, Maryam Tehranipour¹, Nargess Ghayour¹, Jina Khayatzaheh¹,
Hamid Jannati³

1. Dept. Biology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran

2. Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Animal Science Research Department, KANRRC, Mashhad, Iran

Received: 29 May 2011

Accepted: 21 Sept 2011

Abstract

Introduction: Liver plays a pivotal role in glucose and lipid homeostasis. This study was undertaken to evaluate the effects of *L. acanthodes* hydro-alcoholic extract administration on the liver functional and histological parameters in hyperglycemic rats.

Methods: Twenty-four male Wistar rats were randomly allocated into four groups; control, hyperglycemic (STZ), hyperglycemic + insulin (STZ+Ins) and hyperglycemic + extract (STZ+Ext). After a single injection of STZ (55 mg/kg, i.p.) and confirmation of hyperglycemia induction, rats of STZ+Ins and STZ+Ext were daily treated with insulin (5 IU/kg/day) and extract (150 mg/kg/day), respectively, for 21 days. To assess the serum levels of biochemical parameters and liver markers, all rats were kept until the 7th week and then they were sacrificed and their livers were histologically examined.

Results: Serum levels of ALT, AST, ALP, glucose and triglyceride in STZ and STZ+Ins groups were significantly increased in comparison with control and STZ+Ext groups at the 2nd week. At the 4th week, although the mean levels of liver enzymes were increased in STZ+Ext ($p < 0.05$) but its level of significance was lower than STZ and STZ+Ins groups ($p < 0.001$) groups. Microscopic examination of liver sections showed no histological difference between control and experimental samples.

Conclusion: Streptozotocin induced hyperglycemia may result in abnormal levels of liver markers. This liver malfunction is probably caused by hepatocyte membrane damage due to the free radical production induced by hyperglycemia. It seems that antioxidant property of flavonoids constituents of *L. acanthodes*, may prevent hepatocytes damage and therefore reduce the serum levels of liver markers.

Key words: *Launaea acanthodes*, insulin, liver enzymes, hyperglycemia

* Corresponding author e-mail: behnam@um.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

بررسی اثرات هیپرگلیسمی و تجویز عصاره گیاه چرخه *Launaea acanthodes* بر اختلالات عملکردی کبد در موش صحرایی

میترا جلالی^۱، مرتضی بهنام رسولی^{۲*}، مریم تهرانی پور^۱، نرگس غیور^۱، جینا خیاط زاده^۱، حمید جنتی^۳
۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد
۳. تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد
دریافت: ۸ خرداد ۹۰ پذیرش: ۳۰ مهر ۹۰

چکیده

مقدمه: عملکرد کبد، بعنوان اندامی وابسته به انسولین، شدیداً تحت تاثیر دیابت قرار می گیرد. در مطالعه حاضر اثرات تجویز عصاره اتانولی گیاه چرخه بر اختلالات عملکردی و تغییرات احتمالی بافتی کبد در شرایط هیپرگلیسمی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش ها: بدین منظور ۲۴ موش صحرایی نر و بیستار به چهار گروه کنترل، هیپرگلیسمی (STZ; 55 mg/kg)، هیپرگلیسمی+انسولین (STZ+Ins; 5 IU/kg/day) و هیپرگلیسمی+عصاره (STZ+Ext; 150 mg/kg/day) تقسیم شدند. دوره تیمار ۲۱ روز بود و طی این مدت در روزهای ۱۴ و ۲۸ از همه موشها خونگیری و سطوح سرمی فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیمهای کبدی اندازه گیری شد. پس از آن در پایان هفته هفتم از کبد رتھا مقاطع میکروسکوپی تهیه و ساختار کبد مورد بررسی هیستولوژیکی قرار گرفت.

یافته ها: در مقایسه با گروه کنترل، میانگین سطوح سرمی گلوکز و تری گلیسرید در هفته دوم در گروههای STZ و STZ+Ins ($p < 0.05$) و در هفته چهارم سطوح سرمی آنزیمهای کبدی (ALP, ALT, AST) در هر سه گروه تجربی ($p < 0.001$) افزایش معنی دار نشان داد. البته افزایش فاکتورهای بالا در گروه STZ+Ext ($p < 0.05$) بطور آشکاری خفیفتر از دو گروه دیگر بود. از لحاظ بافت شناسی تفاوت مشهودی در مقاطع بافتی کبد در بین گروهها دیده نشد.

نتیجه گیری: هیپرگلیسمی احتمالاً با القای استرس اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکالهای آزاد باعث آسیب غشای هپاتوسیتها و نشت آنزیمهای سیتوزولی به جریان خون می شود. چنین به نظر می رسد که عصاره گیاه چرخه، احتمالاً به دلیل محتوای فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانتی، می تواند از افزایش پیشرونده سطوح آنزیمهای کبدی جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: گیاه چرخه، هیپرگلیسمی، آنزیم های کبدی، انسولین

مقدمه

بتای پانکراس ایجاد می گردد حدود ۱۰ درصد از کل موارد دیابت را تشکیل می دهد [۶]. از آنجا که دیابت نوعی اختلال متابولیک است از اینرو ممکن است اندامهای دخیل در فرآیندهای متابولیک از جمله کبد را نیز درگیر نماید. درمان دارویی دیابت عمدتاً با تجویز داروهای خوراکی صناعی پایین آورنده قند خون مانند بی گوانیدها، سولفونیل اوره ها، تیازولیدین

بیماری دیابت نوع یک، که به علت تخریب سلول های

behnam@um.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

صفراوی استفاده می شود [۳۰]. از اینرو، اندازه گیری سطوح آنزیم های ALT، AST و ALP دارای اهمیت کلینیکی و توکسیکولوژیکی است زیرا تغییر در میزان فعالیت این آنزیم ها نشان دهنده آسیب بافت ناشی از سموم و یا بیماری است [۴،۱۲]. بطوری که افزایش ALT و AST را بعنوان مارکر آسیب هپاتوسلولار و افزایش ALP را بعنوان مارکر نقص در جریان و دفع صفرا در نظر می گیرند [۹]. در تحقیق حاضر برای تعیین اثرات احتمالی حفاظتی- درمانی عصاره گیاه چرخه بر عملکرد کبد، تغییرات سطوح آنزیمهای کبدی و ساختار بافتی کبد در موشهای صحرایی هیپرگلیسمیک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

در این تحقیق از موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده سنی ۴ تا ۵ ماه و محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم استفاده شد. این حیوانات در شرایط استاندارد با دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد و ساعات روشنایی _ تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری و با آب و غذای استاندارد موش صحرایی مورد تغذیه قرار گرفتند. موش های صحرایی به صورت تصادفی به چهار گروه شش تایی شامل یک گروه کنترل و سه گروه آزمایشی تقسیم شدند. گروه کنترل تحت هیچ تیماری نبود. در سه گروه تجربی به منظور القای دیابت نوع یک تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (STZ) با دوز 55 mg/kg وزن بدن انجام شد [۲۷]. ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ به منظور اطمینان از ایجاد دیابت نوع یک قند خون ناشتای حیوانها اندازه گیری و پس از تایید القای هیپرگلیسمی، یکی از گروه ها، بعنوان گروه کنترل مثبت (STZ+Ins)، تحت تزریق زیر پوستی انسولین با دوز 5 IU/kg/day به مدت ۲۱ روز بطور روزانه قرار گرفت. به موشهای گروه دوم جهت تیمار با عصاره گیاه چرخه (STZ+Ext) به روش درون صفاقی عصاره با دوز mg/kg ۱۵۰ به مدت ۲۱ روز بطور روزانه تزریق شد. گروه تجربی سوم به عنوان کنترل منفی (STZ) هیچگونه تیماری دریافت نکرد. این حیوانات به مدت ۷ هفته پس از القای هیپرگلیسمی، در شرایط استاندارد و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. در طی دوره آزمایش در دو مرحله (پایان هفته دوم و هفته

دیون ها و مهارکننده های آلفاگلوکوزیداز و در شرایط پیشرفته بیماری، تجویز انسولین صورت می گیرد [۱۰،۷]. از آنجا که داروهای شیمیایی دارای اثرات جانبی ناخواسته اند بیماران دیابتی و درمان گران بطور روزافزون در جستجوی روشهای درمانی جایگزین و از جمله استفاده از گیاهان دارویی کاهنده قند خون می باشند [۷،۱۷]. در این رابطه گیاهان از دیرباز همواره منبعی تجربه پذیر و تجدید پذیر برای تهیه داروها بوده اند بطوری که منشا بسیاری از داروهای کنونی نیز بطور مستقیم و یا غیرمستقیم از گیاهان است. در بررسی های اتنوبوتانیک اگرچه بیش از ۱۲۰۰ گونه گیاهی که دارای اثرات ضد دیابتی بالقوه می باشند گزارش گردیده است [۷] ولی از گیاه چرخه (*Launaea acanthodes*) صحبتی به میان نیامده است. در این رابطه اهالی بومی بعضی از مناطق بیابانی (کوبری) استان خراسان معتقدند که مصرف جوشانده این گیاه قند خون را پائین می آورد. مقایسه نتایج آزمایشات پاراکلینیکی بعضی از بیماران مبتلا به دیابت قندی، در قبل و بعد از مصرف جوشانده گیاه چرخه نیز تا حدودی موید همین مطلب است. این گیاه که با نامهای چرخان و چرخک نیز شناخته می شود، گیاهی است بیابانی که در طب سنتی از صمغ حاصل از ساقه آن به عنوان داروی مؤثر در درمان بیماریهایی مانند اختلالات عصبی، دردهای موضعی و مفصلی استفاده می شود [۱۱،۱۴]. صمغ گیاه چرخه به دلیل دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی دارای اثرات شبه بنزودیازپینی است و از اینرو برای درمان صرع نیز مورد استفاده قرار می گیرد [۱۱]. نتایج مطالعه ای که اخیراً صورت گرفته است نیز نشان می دهد که اثرات تجویز عصاره آبی-الکلی گیاه چرخه در کاهش قند خون در موش های صحرایی هیپرگلیسمیک با نتایج رضایت بخشی همراه بوده است [۳].

کبد، بعنوان یکی از اندامهای وابسته به انسولین، شدیداً تحت تاثیر دیابت قرار می گیرد [۲۸]. در کلینیک، افزایش سطوح آمینوترانسفرازها، مشتمل بر آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، را بعنوان معیار اختصاصی تشخیص نکرóz هپاتوسلولار در نظر می گیرند [۹]. این آنزیمها با آسیب غشای سلولی هپاتوسیتها به گردش خون آزاد می شوند [۲۶]. همچنین از افزایش سطح آلکالین فسفاتاز (ALP) بعنوان تشخیص بیماری پارانشیمی کبد ناشی از انسداد

چهارم) از تمامی حیوانات نمونه خون تهیه و فاکتورهای بیوشیمیایی خون مانند گلوکز، انسولین، تری گلیسرید، کلسترول، کلسترول-LDL و نیز سطوح سرمی آنزیم های کبدی ALT, AST, ALP اندازه گیری شد. اندازه گیری آنزیم های کبدی در آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر اجتهادی و به روش فوتومتریک انجام شد. کیت تشخیص کمی ALP در سرم با روش DGKC (کینتیک فوتومتری) منطبق با روش استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان ۱۹۷۰ و کیت تشخیص کمی ALT و AST در سرم با روش IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی) مورد استفاده و از شرکت سهامی خاص پارس آزمون تهیه شد. تزریق انسولین و عصاره به ترتیب در گروه های STZ+Ins و STZ+Ext از روز سوم پس از القا دیابت آغاز و به مدت ۲۱ روز انجام شد. کلیه تزریقات بین ساعت ۹ تا ۱۱ صبح صورت گرفت و کلیه اصول اخلاقی مطابق با مبانی کمیته اخلاقی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد رعایت گردید.

در پایان هفته هفتم پس از کشتن حیوانات از کبد آنها مقاطع بافتی تهیه شد و پس از رنگ آمیزی با هوماتوکسیلین - اتوزین مورد بررسی بافت شناسی قرار گرفت. جهت جمع آوری و تهیه عصاره در فصل تابستان و از مناطق اطراف مشهد گیاه

چرخه جمع آوری و در بخش هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه آزاد واحد مشهد مورد شناسایی قرار گرفت. اندام های هوایی گیاه در مجاورت هوا و به دور از تابش نور خورشید خشک گردید و پس از خشک شدن، پودر شده و از الک گذرانده و سپس جهت عصاره گیری مورد استفاده قرار گرفت.

عصاره گیری به روش سوکسله و با اتانول ۷۰٪ انجام گرفت. بدین منظور ۱۰۰ گرم از پودر تهیه شده داخل کاغذ صافی قرار داده شد و درون فلاسک دستگاه قرار داده شد. سپس اتانول ۷۰ درصد در فلاسک ریخته شد و درجه حرارت دستگاه مطابق با نقطه جوش حلال تنظیم گردید. عصاره گیری به مدت ۱۲ ساعت انجام شد.

عصاره بدست آمده به منظور تغلیظ و حذف حلال برای مدت دو ساعت در روتاری قرار داده شد. پس از حذف حلال، خشک کردن عصاره و تعیین رانندومان آن (۲۰ درصد) مقدار ۶۰۰ میلی گرم از آن وزن و در حجم ۸ سی سی آب مقطر حل شد تا محلول پایه برای تزریق به حیوانات حاصل شود. به محلول حاصل به ازاء هر ۸ سی سی آب مقطر ۰/۲ سی سی توئین ۸۰ افزوده شد تا فاز الکلی عصاره به خوبی به صورت محلول در آید. حجم مورد نیاز از محلول پایه برای تزریق به هر موش صحرایی با توجه به دوز تزریقی عصاره (۱۵۰ میلی گرم

جدول ۱- مقایسه میزان سرمی گلوکز، انسولین، تری گلیسرید، کلسترول و کلسترول-LDL در گروه های تجربی و کنترل

Hyperglycemia+Extract		Hyperglycemia+Insulin		Hyperglycemia		Control	Groups Factor
4 th week	2 nd week	4 th week	2 nd week	4 th week	2 nd week		
181.67±59.41	163.33±20.63	306±63.50	338±60.04 *	±19.48 502.17 ****	423.33±52.85 **	133.67±8.03	Glucose (mg/dl)
4.87±0.25	6.5±0.9 *	4.68±0.79	5.1±0.82	3.28±0.22	2.86±0.39 *	3.67±0.42	Insulin (mIU/ml)
74.75±6.26	151.25±15.37 #	105.50±11.31 **	224.5±36.55 # **	100.17±5.93	233.17±18.38 #****	70.83±2.14	Triglyceride (mg/dl)
85.5±2.87	153.2±13.6	91.16±10.35 *	181.83±20.14 # **	96.70±9.74	195.17±14.62 #****	83.17±8.48	Cholesterol (mg/dl)
60±7.32	88.4±3.67	59.83±6.04 ***	92.33±3.77 #***	64.17±6.13	106.17±2.99 #****	56.83±7.05	LDL (mg/dl)

اعداد به صورت میانگین±انحراف از خطای معیار (SEM) ارائه شده اند (n=۶). نتایج آزمون Tukey: $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ مقایسه میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی گروه های تجربی با گروه کنترل. $P<0.05$ مقایسه میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی بین گروه های STZ و STZ+Ins. $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ مقایسه بین هفته دوم با هفته چهارم. STZ+Ext با گروه های STZ و STZ+Ins.

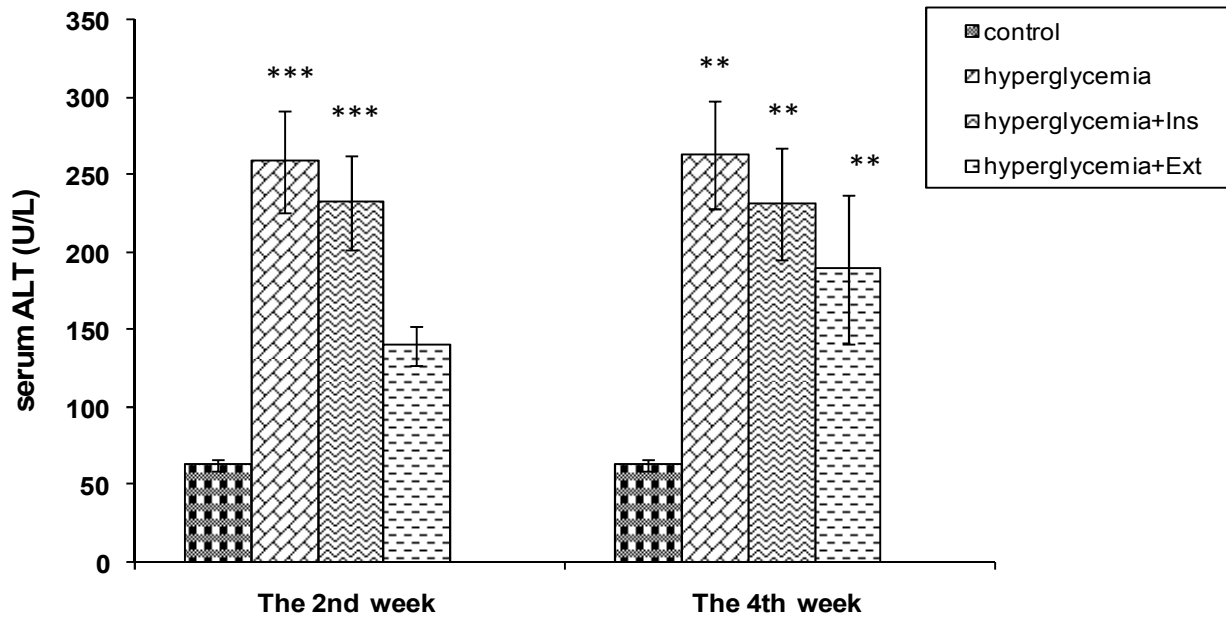
گروههایی که با یکدیگر اختلاف معنی دار داشتند از آزمون Tukey استفاده شد. نمودارهای مربوطه نیز توسط نرم افزار Excel رسم گردید.

یافته ها

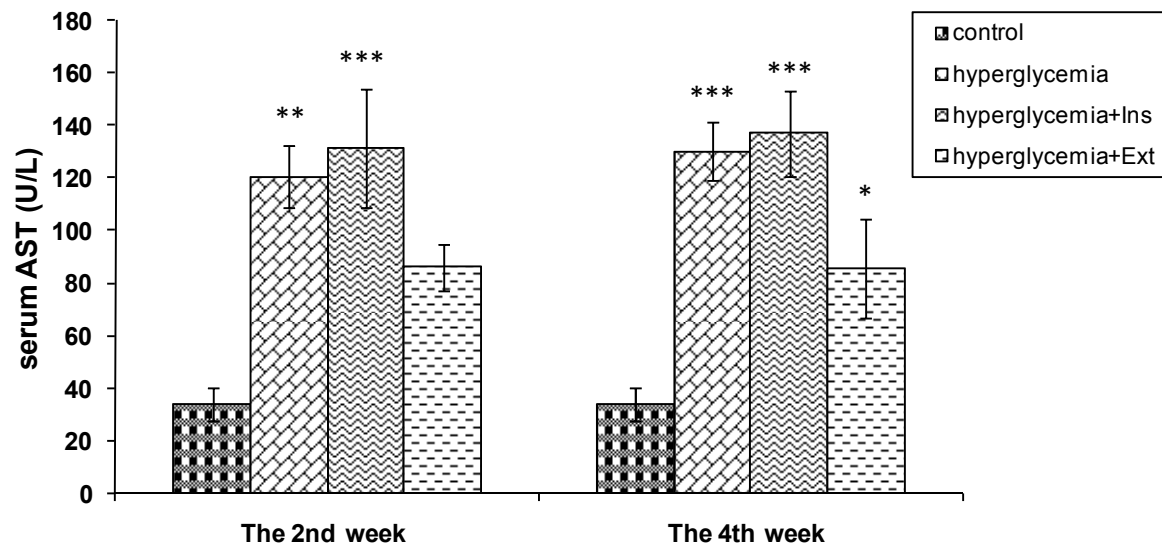
دو هفته پس از القای دیابت، و در مقایسه با گروه کنترل،

بر کیلو گرم وزن بدن) و وزن بدن محاسبه گردید و به صورت درون صفاقی تزریق شد.

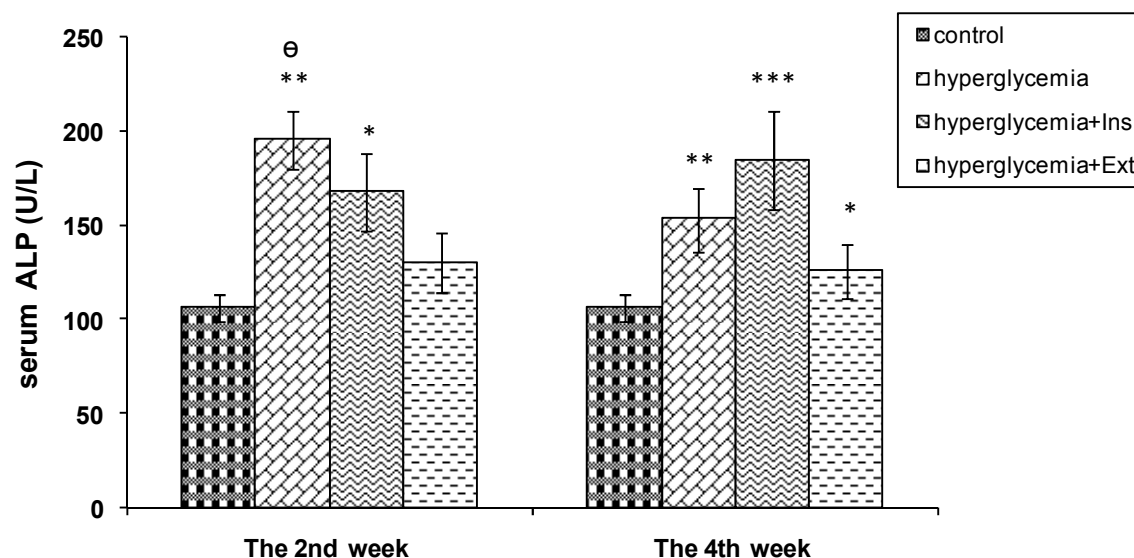
به منظور تجزیه و تحلیل آماری بر روی یافته های به دست آمده، ابتدا با استفاده از نرم افزار SPSS آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA one-way) انجام و از نظر آماری مقادیر $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. در صورت وجود اختلاف معنی دار میان گروهها و به منظور تفکیک



شکل ۱- مقایسه میزان غلظت ALT سرم در گروههای کنترل و تجربی (n=۶). نتایج آزمون آماری Tukey: $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ مقایسه با گروه کنترل.



شکل ۲- مقایسه میزان غلظت AST سرم در گروههای کنترل و تجربی (n=۶). نتایج آزمون آماری Tukey: $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ و $P < 0.05$ مقایسه با گروه کنترل.



شکل ۳- مقایسه میزان غلظت ALP سرم در گروههای کنترل و تجربی (n=۶). نتایج آزمون آماری Tukey: $P < 0.001$ *** ، $P < 0.01$ ** و $P < 0.05$ * مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.05$ $^{\Theta}$ مقایسه با گروه STZ+Ext.

بحث

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می دهد که دو هفته پس از القای دیابت، در مقایسه با گروه کنترل، در گروههای STZ و STZ+Ins سطح گلوکز خون بطور معنی داری بالاست در حالیکه در گروه STZ+Ext این چنین افزایش معنی داری دیده نمی شود (جدول ۱). این یافته، بیانگر اثرات هیپوگلیسمیک عصاره گیاه چرخه، حداقل در کوتاه مدت است. خاصیت پائین آورنده ای قند خون عصاره این گیاه را می توان به اثرات آنتی اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی [۱۴] و یا ترکیبات آلکالوئیدی، ترپنوییدی [۱۹] و گلیکوزیدی [۲۹] موجود در عصاره نسبت داد. فلاونوئیدها دارای اثرات آنتی اکسیدانی [۱۳] هستند و موجب کاهش قند خون می شوند [۲۲]. در مطالعات قدیمی تر، اثرات هیپوگلیسمیک گونه *L. nudicaulis* را به نوعی گلیکوزید به نام بنگالوزید (Bengalenoside) نسبت داده اند [۲]. کسب نتایج مشابه در گروه STZ+Ins با گروه STZ می تواند به علت عدم تشابه ساختاری انسولین انسانی با انسولین رت و یا ناکافی بودن دوز انسولین اگزوزن در کاهش قند خون باشد. زیرا در گروهی که تحت تیمار با انسولین بودند قند خون کماکان در سطوح بالا حفظ شده بود. علاوه بر گلوکز، بالا بودن سطوح سایر فاکتورهای بیوشیمیایی خون از قبیل تری گلیسرید، کلسترول

در گروههای STZ و STZ+Ins افزایش معنی داری در میانگین گلوکز، تری گلیسرید، کلسترول، LDL (جدول ۱)، ALT، AST و ALP (شکل ۱، ۲، ۳) مشاهده شد. هم چنین در گروه STZ+Ext اگرچه افزایش معنی داری در میانگین انسولین و کلسترول ($P < 0.05$) و همچنین LDL ($P < 0.001$) مشاهده شد ولی در میانگین گلوکز، تری گلیسرید (جدول ۱) و سطوح ALT، AST و ALP (شکل ۱، ۲، ۳) اختلاف معنی داری دیده نشد.

چهار هفته پس از القای دیابت، و در مقایسه با گروه کنترل، در گروه STZ میانگین گلوکز ($P < 0.001$) (جدول ۱) و در گروه STZ+Ins میانگین تری گلیسرید ($P < 0.05$) کماکان بطور معنی دار بالا بود (جدول ۱) ولی در مورد سایر فاکتورهای بیوشیمیایی در هر سه گروه تجربی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

در هفته چهارم سطوح سرمی آنزیم های کبدی ALT، AST و ALP در هر سه گروه هیپوگلیسمیک افزایش معنی داری را نشان دادند (شکل ۱، ۲، ۳). مقایسه سطوح سرمی آنزیم های کبدی در بین گروههای تجربی تفاوت معنی داری را نشان نداد. نتایج حاصل از بررسی بافت شناسی نشان داد که از لحاظ ساختاری، تفاوت مشهودی در مقاطع بافتی کبدی نمونه های مربوط به گروههای تجربی و گروه کنترل وجود ندارد (شکل ۴).

واقع اندازه گیری آن مقدار از آنزیم های داخل سلولی است که به جریان خون نشت کرده اند [۱۰]. از آنجا که این آنزیم ها شاخص عملکرد کبد هستند و سطوح نرمال آن ها نشان دهنده عملکرد طبیعی کبد است [۱۰] بنابراین می توان چنین نتیجه گیری کرد که در گروه های STZ و STZ+Ins عملکرد کبد آسیب دیده و در گروه STZ+Ext آسیب عملکردی کبد بطور محسوسی کمتر است.

در موش های صحرایی دیابتی شده، برای افزایش سطوح سرمی آنزیم ها می توان دو دلیل ذکر کرد: ۱) اثرات ناشی از القای دیابت و کمبود انسولین بر متابولیسم کبد [۲۳، ۱۰] و ۲) آسیب غشای هپاتوسیت ها، آسیب غشای هپاتوسیت ها، که منجر به نشت آنزیم ها از سیتوزول به جریان خون می شود، خود ممکنست ناشی از استرس اکسیداتیو حاصل از هیپرگلیسمی باشد [۲۵، ۱۰، ۱۶] و یا از اثرات سمی STZ بر روی کبد [۵، ۱۲] ناشی گردد.

در ارتباط با دلیل اول (تاثیر دیابت بر متابولیسم کبد) می توان چنین گفت که آمینوترانسفرازها، آنزیم های گلوکونئوزیک اند و مستقیماً با تبدیل آمینواسیدها به کتواسیدها مرتبط اند. از آنجا که بیان ژن این آنزیمها به وسیله انسولین مهار می شود [۲۳] بنابراین افزایش سطوح سیتوسولیک و سرمی این آنزیم ها می تواند شاخص اختلال در سیگنالینگ انسولین باشد [۲۳]. علاوه بر این، افزایش کاتابولیسم پروتئینها و گلوکونئوزن دیابتی ممکن است ناشی از افزایش این ترانس آمیناز ها باشد [۲۰].

در ارتباط با دلیل دوم (آسیب غشای هپاتوسیت ها) باید اشاره کرد که جزئیات مکانیسمی که تحت آن آنزیم ها از سیتوسول و میتوکندری هپاتوسیت ها آزاد می شوند بطور دقیق مشخص نیست. در عین حال نتایج حاصل از مطالعات تجربی نشان می دهند که تغییرات هرچند اندک در ساختار و عملکرد غشاء به آنزیم های داخل سلولی اجازه می دهد تا از سلول خارج و وارد فضاهای خارج سلولی شوند [۳۱]. برای آنزیمهای کبدی معمولاً شیب غلظتی بالایی بین هپاتوسیت ها و فضای سینوزوئیدی وجود دارد از اینرو آسیب سلولی به همراه افزایش نفوذپذیری غشاء می تواند موجب نشت آنزیم های سیتوسولی به سینوزوئیدها و از آنجا به جریان خون شود [۳۱]. در همین راستا، برخی از گزارشات منتشر شده نشت آنزیم ها از سیتوسول

LDL در گروههای STZ و STZ+Ins (جدول ۱) حاکی از آنست که هیپرگلیسمی ناشی از تخریب سلولهای بتای جزایر لانگرهانس موجب القای دیابت و بروز اختلال متابولیک گردیده است. این اختلال در گروه STZ+Ext قدری ملایم تر است زیرا در سطح تری گلیسرید سرم افزایش معنی داری دیده نمی شود. نتایج بدست آمده از آنالیز بیوشیمیایی سرم خون در هفته چهارم نشان می دهد که اگرچه سطوح این فاکتورها به مقادیر گروه کنترل نزدیک شده است ولی این کاهش در گروه STZ+Ext محسوس تر است. از اینرو چنین بنظر می رسد که تجویز عصاره توانسته است بطور موثرتری از شدت اختلال متابولیک ناشی از هیپرگلیسمی بکاهد. در توجیه این یافته می توان چنین استدلال کرد که در گروه STZ، کمبود انسولین و در گروههای STZ+Ins و STZ+Ext کمبود و یا ناکافی بودن انسولین موجب ناتوانی سلولها در مصرف گلوکز و متعاقب تشدید مصرف چربی ها و پروتئین ها گردیده است. در این رابطه، مقادیر مربوط به سطح انسولین سرم نشان می دهد که در هفته دوم آزمایش، سطح انسولین در گروه STZ بطور معنی داری کمتر و در گروه STZ+Ext به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل است (جدول ۱). وجود مقادیر قابل اندازه گیری انسولین در سرم خون گروه STZ بیانگر آنست که تزریق استرپتوزوتوسین به احتمال زیاد تمامی سلولهای بتای جزایر لانگرهانس را منهدم نکرده است بنابراین افزایش معنی دار سطح انسولین گروه STZ+Ext، نسبت به گروه کنترل، را می توان به اثرات احتمالی هیپرتروفیک و یا هیپرپلازیک عصاره گیاه چرخه بر سلولهای بتای باقیمانده نسبت داد. مقادیر اندازه گیری شده انسولین در نمونه های سرمی مربوط به هفته چهارم نشان می دهد که در گروه STZ سطح انسولین بتدریج افزایش و در گروههای STZ+Ins و STZ+Ext بتدریج کاهش یافته (احتمالاً بدلیل اثرات ناشی از فیدبک منفی) و به مقدار گروه کنترل نزدیک شده است (جدول ۱).

نتایج حاصل از اندازه گیری مارکرهای کبدی در پایان هفته دوم در گروههای STZ و STZ+Ins نشان می دهد که، در مقایسه با گروه کنترل، سطوح سرمی آنزیم های ALT، AST و ALP افزایش معنی داری یافته است در حالیکه در گروه STZ+Ext این چنین افزایشی دیده نمی شود (شکل ۱، ۲، ۳). اندازه گیری سطوح سرمی آمینوترانسفرازها، ALT و AST، در

به جریان خون را به اثرات هپاتوتوکسیک STZ نسبت می دهند [۵،۱۲]. بر پایه گزارشات موجود، استرپتوزوتوسین از طریق گلوکز ترانسپورتر ۲ (GLUT2) جذب سلول های بتا می شود و سپس با کاهش سطح سلولی NAD^+ موجب نکرور سلول های بتا می گردد [۲۷]. از آنجا که GLUT2 علاوه بر سلول های بتا در کلیه و کبد جوندگان نیز بیان می شود، بنابراین این احتمال وجود دارد که جذب STZ توسط سلول های کلیوی و کبدی، مشابه با سلول های بتا، این سلول ها را نیز در معرض نکرور سلولی قرار دهد. از این رو اثرات احتمالی خارج پانکراسی STZ را نمی توان نادیده گرفت [۲۷].

نتایج حاصل از بررسی های کلینیکی و مطالعات تجربی نشان می دهند که استرس اکسیداتیو، به عنوان عدم تعادل بین اکسیدانت ها و آنتی اکسیدانت ها، در پاتوژنز بیماری دیابت و عوارض ناشی از آن نقش بسزایی دارد [۱۵]. یکی از منابع عمده رادیکال های آزاد، واکنش گلوکز با پروتئین ها و تولید محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون پیشرفته، که به نوبه خود تولید رادیکال های آزاد را افزایش می دهد، می باشد [۱۵،۱۶]. بیماران مبتلا به دیابت نوع یک، علاوه بر هیپرگلیسمی، غالباً در معرض هیپرکتونمی و یا کتوزیس، که به دلیل مصرف چربی رخ می دهد نیز می باشند. در این رابطه افزایش پراکسیداسیون چربی، در بسیاری از بافت ها از جمله کبد [۱۲]، افزایش تولید ROS ناشی از کتوزیس و بدنال آن وقوع استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد سلول گزارش گردیده است [۱۵]. در این رابطه، ترکیبات طبیعی از جمله اسانس ها و عصاره بعضی از گیاهان، بدلیل خواص آنتی اکسیدانی [۲۱] می توانند غشاهای سلولی و ملکولهای حیاتی را در مقابل اکسیدانت ها حفظ کنند [۱۸،۲۴]. عصاره گیاه چرخه به احتمال زیاد دارای این چنین خواص آنتی اکسیدانی است.

نتایج حاصل از بررسی بافت شناسی کبد، که در طی آن فاکتورهایی از قبیل ذخیره چربی در هپاتوسیت ها، وجود یا عدم وجود فیبروز، وضعیت هسته و عروق پورت و مجاری صفراوی مورد توجه قرار گرفتند، نشان می دهد که از نظر فاکتورهای

بالا بین گروههای تجربی و کنترل تفاوت مشهودی وجود ندارد و ساختار کبد در طی دوره آزمایش (۷ هفته) دست نخورده باقی مانده است (شکل ۴). نتایج منتشر شده مربوط به برخی از مطالعات انسانی نیز حاکی از آنست که در بیماران مبتلا به دیابت نوع یک، علی رغم وجود تست های کبدی غیرنرمال، بافت کبد دست نخورده و طبیعی باقی می ماند [۸]. البته در برخی از مطالعات تجربی آسیب های بافتی مثل تجمع قطرات چربی و کاهش سطح گلیکوژن در سیتوپلاسم هپاتوسیت ها در ۸ هفته پس از القای دیابت گزارش گردیده است [۳۱]. بنابراین چنین به نظر می رسد که، حداقل در کوتاه مدت، بیماری دیابت و یا هیپرگلیسمی القایی ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین موجب آسیب ساختاری در بافت کبد نمی شود و از اینرو بین سطوح سرمی افزایش یافته آنزیم های کبدی و میزان آسیب هپاتوسیتها رابطه قدرتمندی وجود ندارد.

در موش صحرایی، هیپرگلیسمی القاء شده ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین اگرچه عملکرد و متابولیسم کبد را به سرعت تحت تاثیر قرار می دهد ولی در کوتاه مدت موجب تغییرات هستیتولوژیک در بافت کبد نمی شود. بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر می توان چنین نتیجه گیری کرد که تجویز عصاره آبی- الکلی گیاه چرخه به موشهای صحرایی هیپرگلیسمیک قادر است از افزایش شدید سطوح سرمی گلوکز و آنزیم های کبدی جلوگیری کند. این چنین اثرات حفاظتی- درمانی را می توان به ترکیبات فلاونوئیدی و خواص آنتی اکسیدانتی عصاره گیاه چرخه نسبت داد.

سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مساعدتهای صمیمانه آقای دکتر ناصر مهدوی شهری در ارزیابی هیستولوژیکی مقاطع بافتی کبد و نیز همکاری کارشناسان و تکنسینهای گروه زیست شناسی در اجرای پروژه حاضر اعلام می دارند.

References

- [1] Aiken SP, Brown WM. Treatment of epilepsy: Existing therapies and future developments. *Front Biosci* 5 (2000) 124-152.
- [2] Augusti KT. Hypoglycaemic action of bengalenside a glucoside isolated from *Ficus bengalensis* Linn- in normal and alloxan diabetic rabbits. *Indian J Physiol Pharmacol* 19 (1975) 218-20.
- [3] Behnam-Rassouli M, Ghayour N, Ghayour MB, Ejtehadi MM. Investigating the effects of hydro-alcoholic extract of *Launaea acanthodes* on the serum levels of glucose, insulin, lipids and lipoproteins in streptozotocin induced type I diabetic rats. *Arak Medical University Journal (AMUJ)* (2011) In Press.
- [4] Bolkent S, et al. The effects of vitamin B6 on the liver of diabetic rats: A morphological and biochemical study. *IUFS J Biol* 67 (2008) 1-7.
- [5] Chandramohan G, Al-Numair KS, Pugalendi KV. Effect of 3-hydroxymethyl xylitol on hepatic and renal functional markers and protein levels in streptozotocindabetic rats. *African Journal of Biochemistry Research*, 3 (2009) 198-204.
- [6] Conget I. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Rev Esp Cardiol*, 55 (2002) 528-535.
- [7] Dey L, Attele AS, Yuan CS. Alternative therapies for type 2 diabetes. *Altern. Med. Rev.* 7 (1) (2002) 45 – 58.
- [8] Harris EH. Elevated liver function tests in type 2 diabetes. *Clin Diabetes* 23 (2005) 115-119.
- [9] Hasan FAM, Owyed S. Interpretation of liver chemistry tests. *Bull Kuwait Inst Med Spec.* 2 (2003) 27-31.
- [10] Hassanen NHM. Protective effect of cinnamon clove and ginger spices or their essential oils on oxidative stress of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*.18 (2010) 137-154.
- [11] Karimidokht shahrbabaki A, Oryan S, Parivar K. Anticonvulsant activity of ethanolic extract and aqueous fraction of *Launaea acanthodes* gum in comparison with diazepam in mice. *JQUMS* 13 (2009) 14-20.
- [12] Koyuturk M, Tunali S, Bolkent S, Yanardag R, et al. Effects of vanadyl sulfate on liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Trace Elem Res* 104 (2005) 233-247.
- [13] Lukacinova A, Mojzis OJ, Benacka R, Keller J, Maguth T, Kurila P and et all. Preventive Effects of Flavonoids on Alloxan-Induced Diabetes Mellitus in Rats. *ACTA VET. BRNO* 77 (2008) 175-182.
- [14] Mahmodi Y, Yasa N. Investigation of chemical structure of *Launaea Acanthodes* (Bioss) O. Kontz flavonoids. [dissertation] *La. Pharmacology faculty*, (1995), (MO): 3346 Tehran University.
- [15] Manna P, Das J, Ghosh J, Sil PC. Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, I κ B α /NF- κ B, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radical Bio Med* 48 (2010) 1465-1484.
- [16] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem and Moleccular Toxicology* 17 (2003) 24-38.
- [17] Marles R, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 2 (1995) 137- 46.
- [18] Ohrvall M, Nalsen C, Vessby B. Vitamin E improves the antioxidative capacity but not the insulin sensitivity in elderly men. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 7 (1997) 9-15.
- [19] Piazza L, Bertini S, Milany J. Extraction and structural characterization of the polysaccharide fraction of *Launaea acanthodes* gum. *J.carbpol* 79 (2) (2009) 449-454.
- [20] Prakasam A, Sethupathy S, Pugalendi K. V. Influence of casearia esculenta root extract on protein metabolism and marker enzymea in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pol J Pharmacol* 56 (2004) 587-593.
- [21] Pulla Reddy CHA, Iokesh BR. studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid prooxidation of rat liver microsomes. *Mol Cel Biochem.* 111 (1992) 117- 240.
- [22] Ragavan B, Krishnakumari S. Antidiabetic effect of *T. arjuna* bark extract in alloxan induced diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21 (2) (2006) 123-128
- [23] Ramesh B, Pugalendi KV. Impac of umbellifero (7-hydroxycoumarin) on hepatic marker enzymes in streptozotociv diabetic rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 38 (2006) 209-210.
- [24] Rice Evans CA, Burdon RM. Free radical damage and its control. *Amsterdam Elseri* 46-9 (1994) 113.

- [25] Sultan MT, Butt MS, Anjum FM, Jamil A. Influence of black cumin fixed and essential oil supplementation on markers of myocardial necrosis in normal and diabetic rats. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (2009) 1450-1455.
- [26] Thapa BR, Walia A. Liver function tests and their Interpretation. *Indian J Pediatr* 74 (2007) 663-671.
- [27] Thulesen J, Qrskov C, Holst J, Poulsen S, et al. Short term insulin treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats. *Endocrinology* 138 (1997) 62-68.
- [28] Tolman KG, et al. Narrative review: Hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 14 (2004) 964-959.
- [29] Wamegh A, Aeinehchi Y, Yasa N. Studies on *Launaea acanthodes* exudates. [dissertation]. (1986).(MO): *La. Pharmacology faculty*, Tehran University.
- [30] Yap CY, Aw TC. Liver function tests. *Proceedings of Singapore Healthcare* 19 (2010) 80-82.
- [31] Zafar M. Naeem-ul-Hassan Naqvi S. Effects of STZ-induced diabetes on the relative weights of kidney, liver and pancreas in albino rats: A comparative study. *Int J Morphol* 28 (2010) 135-142.