

اثر آنالژزیک عصاره آبی برگ گشنیز در موش‌های صحرایی نر دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین

دکتر مهرداد روغنی، علی باقری، سید مسعود اطیابی، علی هداوند خانی

چکیده

مقدمه: هیپرآلژزی یکی از علایم مهم نوروپاتی دیابتی است که از شکایات بالینی افراد مبتلا محسوب می‌شود و نحوه زندگی این افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تعديل درد در این افراد از اهمیت زیادی برخوردار است، از این رو، در این مطالعه اثر آنالژزیک عصاره آبی برگ گشنیز در موش‌های صحرایی نر که با استرپتوزوتوسین (STZ) در آنها دیابت قنده ایجاد شده بود، با استفاده از آزمون فرمالین در دو فاز حاد و مزمن بررسی شد. مواد و روش‌ها: در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۵۰ گرم استفاده شد. موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه شاهد، گروه دیابتی و گروه دیابتی درمان شده با عصاره آبی برگ گشنیز تقسیم شدند. برای القای دیابت در حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت تک دوز به میزان mg/Kg ۶۰ استفاده گردید. پس از گذشت یک ماه، آزمون فرمالین روی تمام موش‌ها انجام گرفت. یافته‌ها: نتایج به دست آمده از آزمون فرمالین نشان داد که میزان درد در موش‌های دیابتی پس از گذشت یک ماه در ایتروال دوم از فاز حاد آزمون فرمالین (فاصله زمانی ۱۰-۵۰ دقیقه) افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد (افزایش ۷۶٪). در حالی که تفاوت موجود بین دو گروه شاهد و دریافت کننده عصاره آبی برگ گشنیز در همین فاصله زمانی کمتر معنی‌دار ($p > 0.05$) است. با وجود این، میزان درد در موش‌های دیابتی دریافت کننده عصاره در دو فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین هیچ گونه تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نشان نداد. نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز عصاره آبی برگ گشنیز به میزان mg/Kg ۱۰۰ به مدت یک ماه به موش‌های دیابتی کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز خون و میزان احساس درد در مراحل حاد و مزمن آزمون فرمالین به وجود نمی‌آورد.

واژگان کلیدی: دیابت تیپ ۱، گشنیز، هیپرآلژزی، آزمون فرمالین، موش صحرایی

اعصاب محیطی یکی از شکایات مهم بالینی افراد مبتلا به دیابت قنده است و کیفیت زندگی این افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین تعديل درد در این افراد از اهمیت زیادی برخوردار است.^{۱،۲} نتایج برخی تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که قند خون بالا با اعمال اثرات توکسیک بر سیستم عصبی محیطی یکی از علل بروز نوروپاتی دردناک است. علاوه بر این اثرات سیستمیک هیپرکلیسمی نیز می‌تواند موجب بروز نوروپاتی شود.^۳ به علاوه، نتایج برخی تحقیقات دیگر نشان می‌دهد که هیپرکلیسمی تأثیری در تغییر آستانه درد ندارد.^۴

مقدمه

دیابت قنده یکی از شایعترین بیماری‌های آندوکرین به شمار می‌رود که هیپرگلیسمی ناشی از آن با عوارض متعددی از جمله افزایش احساس درد (هیپرآلژزی) و علایم نوروپاتی محیطی همراه است. درد ناشی از نوروپاتی

گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی،
دانشگاه شاهد
نشانی مکاتبه: تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدالله زاده
(دهکده)، دانشکده پزشکی شاهد، دکتر مهرداد روغنی
E-mail: mehjour@yahoo.com

گردید. پس از ۴ ساعت محلول به دست آمده از صافی رشد و روی بن ماری خشک گردید. عصاره تا زمان استفاده در دمای ۲۰-۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. محلول عصاره با غلظت‌های پایین‌تر از طریق حل نمودن آن در محلول سالین فیزیولوژیک به دست آمد.

روش انجام کار

در این بررسی از آن دسته موش‌های صحرایی نر استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقاری حالت روزه‌داری میزان گلوکز سرم آنها پایین‌تر از حد 200 mg/dL بود. به علاوه، ملاک دیابتی شدن موش، میزان گلوکز بالاتر از این حد در نظر گرفته شد.^۱ موش‌ها به طور کاملاً تصادفی به سه گروه تقسیم شدند. گروه شاهد شامل موش‌های سالمی که عصاره دریافت نکرده بودند، گروه دیابتی شامل موش‌های دیابتی که عصاره دریافت نکرده بودند و گروه دیابتی تحت تزریق عصاره آبی برگ گشتنیز که با تزریق 100 mg/Kg عصاره آبی برگ گشتنیز به صورت یک روز در میان به مدت یک ماه تحت درمان قرار گرفتند. تعداد متوسط موش در هر گروه چهارده سر بود. برای دیابتی نمودن حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین به صورت داخل صفاقی و تک دوز به میزان 60 mg/Kg حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده گردید. حجم تزریق محلول به حیوانات در هر گروه $5/0\text{ میلی‌لیتر}$ بود. پس از گذشت یک ماه، آزمون فرمالین روى تمام موش‌ها انجام گرفت. در این ارتباط در مورد هر موش، آزمون فرمالین فقط یک بار انجام پذیرفت. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنژیمی گلوکز اکسیداز (زیست شیمی) و با استفاده از اسپکتروفوتومتر به انجام رسید.

آزمون فرمالین

برای این آزمون از روش متداول دوبوئیسون و دنی استفاده گردید.^۱ بدین ترتیب که حیوان در یک محفظه از جنس پلاکسی کلاس ($30\times30\times30\text{ سانتی‌متر}$) قرار می‌گیرد. پس از گذشت یک ساعت 50 میکرو‌لیتر از محلول فرمالین $2/5$ درصد به صورت زیر جلدی به کف پای حیوان تزریق شد و شدت درد حیوان بر اساس تقسیم‌بندی زیر به چهار درجه تفکیک گردید: صفر- حیوان بدون توجه به پای تزریق شده می‌نشینید یا راه می‌رود؛ ۱- پای حیوان با محفظه تماس داشته، ولی حیوان وزن بدن را بیشتر روی پای سالم خود می‌اندازد؛ ۲- حیوان پنجه دردناک را کاملاً از سطح محفظه

با توجه به اینکه گیاه گشتنیز^۲ در درمان سنتی دیابت مورد استفاده قرار گرفته است و نتایج بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که عصاره گیاه گشتنیز دارای خاصیت پایین‌آورندگی قند خون است,^{۳-۷} به نظر می‌رسد که عصاره این گیاه می‌تواند در درمان هیپرآلرژی ناشی از نوروپاتی دیابتی مؤثر واقع شود. عصاره گشتنیز با افزایش فعالیت آنزیم گلیکوژن ستاز و افزایش غلظت گلیکوژن کبدی و تحریک مسیر گلیکولیز و پنتوز فسفات از طریق افزایش آنزیم‌های گلیکولیتیک و گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز و مهار آنزیم‌های گلوکونوژنیک و گلیکوژن فسفریلاز و در نتیجه مهار روندهای گلیکوژنولیز و گلیکوژنولیز بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها مؤثر است و سطح گلوکز خون را کاهش می‌دهد.^۸ همچنین فعالیت شبه انسولین و خاصیت آزاد کنندگی انسولین در گیاه گشتنیز در تحقیقات اخیر به اثبات رسیده است.^۹ لذا در این پژوهش اثر عصاره آبی برگ گشتنیز بر میزان احساس درد در موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت قندی القا شده توسط استرپتوزوتوسین با استفاده از آزمون فرمالین در دو مرحله حاد و مزمن مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

حيوانات

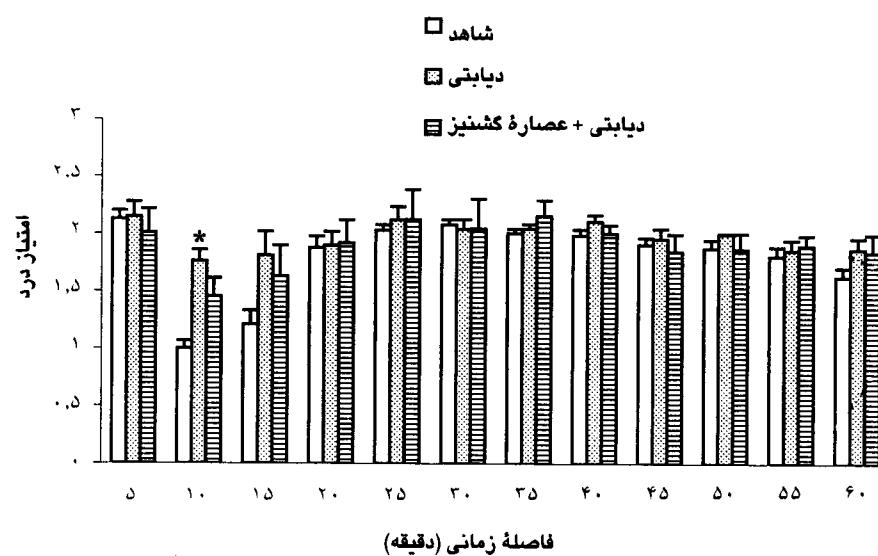
در این تحقیق از موش صحرایی نر آلبینو نژاد ویستار^{۱۰} در محدوده وزنی $250-250\text{ گرم}$ استفاده شد. حیوانات در شرایط نوری طبیعی در دمای ۱۹ تا ۲۳ درجه سانتیگراد نگهداری شدند^{۱۱} و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمامی موش‌ها حداقل یک هفته قبل از شروع آزمایش‌ها به حیوانخانه داشکده پزشکی و یک ساعت قبل از انجام آزمون فرمالین به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا با شرایط آزمایشگاهی سازش حاصل نمایند.

روش تهیه عصاره آبی برگ گشتنیز

پس از تهیه گشتنیز در فصل تابستان و تأیید علمی و سیستماتیک آن، برگ‌های سبز و تازه آن جدا و سپس در درجه حرارت اتاق و در سایه خشک شدند. 100 گرم از پودر برگ خشک شده به یک لیتر آب 60 درجه سانتیگراد اضافه

i- *Coriandrum sativum*

ii- Wistar



نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SE}$ نشان داده شده‌اند. * $p < 0.001$

نمودار ۱- اثر تزریق عصاره آبی برق گشنیز به میزان 100 mg/Kg بر میزان احساس درد در فواصل زمانی ۱۰ دقیقه‌ای در موش‌های صحرایی دیابتی شده پس از گذشت یک ماه در آزمون فرمالین.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر اثر ضد درد عصاره آبی برق گشنیز به میزان 100 mg/Kg (یک روز در میان) به صورت داخل صفاقی پس از گذشت یک ماه در موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (60 mg/Kg) با استفاده از آزمون فرمالین مورد بررسی قرار گرفت. با اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم مشخص شد که میزان قند خون در دو گروه دیابتی و دیابتی تحت درمان با عصاره، بالاتر از mg/dL ۴۰۰ می‌باشد و گروه درمان تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی از این نظر نشان نداد (جدول ۱). نتایج به دست آمده از آزمون فرمالین نشان داد (نمودار ۱) که میزان درد در موش‌های دیابتی پس از گذشت یک ماه در اینتروال دوم از فاز حاد آزمون فرمالین (فاصله زمانی ۵-۱۰ دقیقه) افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد (افزایش ۷۶٪)، در حالی که تفاوت موجود بین دو گروه شاهد و دریافت کننده عصاره آبی برق گشنیز در همین فاصله زمانی کمتر معنی‌دار ($p < 0.05$) است. با این وجود میزان درد در موش‌های دیابتی دریافت کننده عصاره در دو فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه

بلند می‌کند؛ و ۳ - حیوان پنجه تزریق شده را از شدت درد می‌لیسد، گاز می‌گیرد یا به شدت نکان می‌دهد. ثبت پاسخ‌های رفتاری بلافضلله پس از تزریق فرمالین آغاز و تا دقیقه ۶۰ ادامه می‌یافتد. در این ارتباط پاسخ در هر ۱۵ ثانیه ثبت و به عنوان شاخصی از میزان درد در آزمون فرمالین در نظر گرفته می‌شود. با استفاده از این روش اعداد ۰ تا ۲ برای امتیاز درد در زمان‌های مختلف به دست می‌آید. میانگین درد در ده دقیقه اول بعد از تزریق فرمالین به عنوان مرحله ابتداییⁱ یا حاد و در دقایق ۱۶ تا ۶۰ به عنوان مرحله مزمن یا تأخیریⁱⁱ در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

تمام داده‌ها در بررسی حاضر به صورت میانگینⁱⁱⁱ انحراف معیار بیان شده است. برای آنالیز آماری از آزمون آنالیز توکی^{iv} استفاده گردید. به علاوه $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز آماری از برنامه Instat Graphpad و برای رسم نمودار از برنامه Microsoft Excel 97 استفاده گردید.

- i- First phase
- ii- Latent phase
- iii- Tukey

محیطی و فعل شدن مسیرهای بیوشیمیایی آلدوز ردوکتاز و مسیر سنتز الکل‌های با چند گروه هیدروکسیل نظری اینوزیتول نسبت داده شده است.^{۱۱-۱۲} به علاوه وجود دیابت پردازش سیگنال‌های درد را در تابع تحت تأثیر قرار می‌دهد.^{۱۳} با این وجود شواهدی یافت می‌شود که بر آن اساس هیپرگلیسمی به تنهایی نمی‌تواند در برخی مدل‌های تجربی دیابت هیپرآلرژی ایجاد نماید.^{۱۴} شواهد تحقیقاتی متعددی مبنی بر اثربخشی عصاره گیاه گشنیز در گیاه درمانی دیابت قدمی یافت می‌شود که در این ارتباط وجود مواد پایین آورنده قند خون در آن به اثبات رسیده است و خود عصاره فعالیت آزادکننده انسولین و فعالیت شبه انسولینی نشان می‌دهد.^{۱۵} به علاوه نتایج تحقیقات متعدد مشخص نموده است که عصاره گیاهانی نظری گشنیز می‌تواند قند خون را کاهش دهد و این عمل را عمده‌تر از طریق افزایش تجزیه مواد قندی، افزایش تحمل گلوکز، افزایش فعالیت آنزیم‌های هگزوکیناز و فسفوگلوكوموتاز در راه گلیکولیز، افزایش سنتز گلیکوژن و کاهش تجزیه آن (کاهش فعالیت آنزیم گلیکوژن فسفریلان) در کبد، افزایش مصرف گلوکز در راه پنتوز فسفات (افزایش فعالیت آنزیم گلوکز ۶-فسفات دهیدروژنان) و کاهش گلوكونثروژن (کاهش فعالیت آنزیم گلوکز ۶-فسفاتاز در کبد) انجام می‌دهند.^{۱۶} نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین را می‌توان به عنوان مدل درد مزمن به حساب آورد که در مورد آن نشانه‌های هیپرآلرژی و آلودگی^{۱۷} در کوتاه مدت (۱ الی دو ماه) به خوبی مشاهده می‌شود.^{۱۸-۱۹} در بررسی حاضر با توجه به این موضوع که هیچ گونه کاهش معنی‌دار در میزان گلوکز سرم در موش‌های دیابتی درمان شده با عصاره آبی برگ گشنیز در مقایسه با گروه دیابتی مشاهده نشد، منطقی به نظر می‌آید که میزان درد در گروه دیابتی نشان ندهد که این بخوبی در نتایج به دست آمده مشهود است.

به طور خلاصه، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز عصاره آبی برگ گشنیز به میزان ۱۰۰ mg/Kg (یک روز در میان) به صورت داخل صفاقی پس از گذشت یک ماه به موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (۶۰ mg/Kg) تغییر معنی‌دار در میزان گلوکز خون و میزان احساس درد در آزمون فرمالین (دو فاز حاد و مزمن) در مقایسه با گروه دیابتی (که عصاره دریافت نمی‌کند) به وجود نمی‌آورد. نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین به طور غیرمنتظره یک رفتار تشديد شده مربوط به درد را در آزمون فرمالین به دنبال تجویز حرکت‌های شیمیایی به داخل پنجه پا پس از گذشت ۳-۴ هفته نشان می‌دهند که خود دلالت بر وجود مکانیسم‌های غیر طبیعی و متعدد در پردازش سیگنال‌های محیطی درد دارد.^{۲۰}

قبلًا وجود هیپرآلرژی مکانیکی به عنوان اولین نشانه نوروپاتی دیابتی به اثبات رسیده است که علت آن تا حدودی به اثرات توکسیک مقادیر بالای گلوکز بر سیستم عصبی

دیابتی درمان نشده نشان نداد. جدول (۲) میزان درد را در دو مرحله حاد و مزمن و نمودار (۱) میزان درد را در فواصل زمانی مختلف طی یک ساعت در گروه‌های مختلف در آزمون فرمالین نشان می‌دهد.

جدول ۱- اثر عصاره آبی برگ گشنیز بر میزان گلوکز سرم در گروه‌های مختلف

| هفت | شاهد | دیابتی | دیابتی+عصاره گشنیز |
|-----|----------------------|----------------------|----------------------|
| . | $10.7/4 \pm 0.8$ * | $9.9/8 \pm 0.6/1$ | $10.8/9 \pm 0.7$ |
| ۴ | $10.1/9 \pm 0.6/4$ † | $4.57/1 \pm 1.7/8$ † | $4.29/6 \pm 1.9/2$ † |

* نتایج به صورت Mean \pm S.E.M. بیان شده است.

† $p < 0.0005$ در مقایسه با گروه شاهد

جدول ۲- اثر عصاره آبی برگ گشنیز بر میزان درد در گروه‌های مختلف در آزمون فرمالین

| مرحله | شاهد | دیابتی | دیابتی+عصاره گشنیز |
|-------|-------------------|-------------------|--------------------|
| حاد | $1/56 \pm 0.07$ ‡ | $1/95 \pm 0.12$ † | $2/11 \pm 0.18$ ‡ |
| مزمن | $1/91 \pm 0.06$ | $1/99 \pm 0.08$ | $1/97 \pm 0.16$ |

* نتایج به صورت Mean \pm S.E.M. بیان شده است.

‡ $p < 0.001$ در مقایسه با گروه شاهد

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تجویز عصاره آبی برگ گشنیز به میزان ۱۰۰ mg/Kg (یک روز در میان) به صورت داخل صفاقی پس از گذشت یک ماه به موش‌های دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین (۶۰ mg/Kg) تغییر معنی‌دار در میزان گلوکز خون و میزان احساس درد در آزمون فرمالین (دو فاز حاد و مزمن) در مقایسه با گروه دیابتی (که عصاره دریافت نمی‌کند) به وجود نمی‌آورد. نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین به طور غیرمنتظره یک رفتار تشديد شده مربوط به درد را در آزمون فرمالین به دنبال تجویز حرکت‌های شیمیایی به داخل پنجه پا پس از گذشت ۳-۴ هفته نشان می‌دهند که خود دلالت بر وجود مکانیسم‌های غیر طبیعی و متعدد در پردازش سیگنال‌های محیطی درد دارد.^{۲۰} قبلًا وجود هیپرآلرژی مکانیکی به عنوان اولین نشانه نوروپاتی دیابتی به اثبات رسیده است که علت آن تا حدودی به اثرات توکسیک مقادیر بالای گلوکز بر سیستم عصبی

سپاسگزاری

نویسنده‌گان مقاله مراتب تشکر وافر خود را از سرکار خانم فربنا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد در تهیه عصاره و کمک به انجام آزمایش‌ها اعلام می‌دارند.

بالاتر و برای مدت طولانی‌تر در مدل تجربی دیابت در تحقیقات آتی به عنوان یک پیشنهاد توصیه می‌شود.

References

1. Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 47:123-8.
2. Dobretsov M, Hastings SL, Romanovsky D, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia. *Brain Res* 2003; 960:174-83.
3. Dobretsov M, Hastings SL, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rats with chronic perfusion of lumbar dorsal root ganglion with hyperglycemic solution. *J Neurosci Methods* 2001; 110:9-15.
4. Raz I, Hasdai D, Seltzer Z, Melmed RN. Effect of hyperglycemia on pain perception and on efficacy of morphine analgesia in rats. *Diabetes* 1988; 37:1253-9.
5. Chithra V, Leelamma S. *Coriandrum sativum*--effect on lipid metabolism in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. *J Ethnopharmacol* 2000; 71:457-63.
6. Gray AM, Flatt PR. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). *Br J Nutr* 1999; 81:203-9.
7. Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Effects of vanadate, insulin and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) on creatine kinase levels in tissues of diabetic rat. *Indian J Exp Biol* 1999; 37:200-2.
8. Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* 1990; 33:462-4.
9. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4:161-74.
10. Cesena RM, Calcutt NA. Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neurosci Lett* 1999; 262:101-4.
11. Chithra V, Leelamma S. *Coriandrum sativum* changes the levels of lipid peroxides and activity of antioxidant enzymes in experimental animals. *Indian J Biochem Biophys* 1999; 36:59-61.
12. Calcutt NA. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol* 2002; 50:205-28.
13. Piercy V, Banner SE, Bhattacharyya A, Parsons AA, Sanger GJ, Smith SA, et al. Thermal, but not mechanical, nociceptive behavior is altered in the Zucker Diabetic Fatty rat and is independent of glycemic status. *J Diabetes Complications* 1999; 13:163-9.
14. Courteix C, Bardin M, Chantelauze C, Lavarenne J, Eschalier A. Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. *Pain* 1994; 57: 153-60.