Original Article

Evaluation of antioxidant effects of harmaline in NMRI diabetic male mice

Yaghoubi M, Jafary H*, Yaghmaei P

Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 2021/03/31 | Accepted: 2021/11/3

Abstract:

Background: Diabetes is a metabolic disease that can causes complications such as oxidative stress and decreased levels of antioxidant enzymes. In researches, it has been found that the alcoholic extract of pecan is effective in the treatment of diabetes. Harmaline is an alkaloid of pecan extract, which has antioxidant properties. In this study, models of type 1 diabetic mice were used to evaluate the properties of harmaline.
Materials and Methods: In this study, 40 male NMRI mice were used. Mice were divided into 5 groups of eight including control (ordinary food and water recipient), diabetic (mice that became diabetic with streptozotocin), sham (diabetic mice received only the solvent of harmalin, distilled water, during the experimental stages), experimental groups 1(50 mg/kg harmaline) and 2 (100 mg/kg harmaline). At the end of the harmaline treatment period, the animals were anesthetized with ether and blood samples were taken from all groups. Glucose, insulin, lipid profile, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured in rat serum. Sampling of pancreatic tissue was performed using western blotting method to measure insulin changes in experimental groups.
Results: The levels of insulin, HDL, superoxide dismutase and catalase in treatment groups had a significant increase and the levels of glucose, MDA, LDL and cholesterol in treatment groups showed a significant decrease.
Conclusion: Treatment of mice with harmaline can improves the condition of diabetic animals.

Keywords: Harmaline, Antioxidant, Diabetes, Antioxidant enzyme

***Corresponding Author**
Email: h-jafary@srbiau.ac.ir
Tel: 0098 912 459 5302
Fax: 0098 21 448 65767

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, February, 2022; Vol. 25, No 6, Pages 1294-1302

Please cite this article as: Yaghoubi M, Jafary H, Yaghmaei P. Evaluation of antioxidant effects of harmaline in NMRI diabetic male mice. ***Feyz*** 2022; 25(6): 1294-1302.

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی هارمالین در موش‌های نر دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین نژاد NMRI

مریم یعقوبی[۱]، هانیه جعفری[۲*]، پریچهره یغمایی[۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: دیابت بیماری متابولیکی می‌باشد که سبب کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. مشخص شده است که عصاره الکلی گیاه اسپند در روند بهبود بیماری دیابت مؤثر می‌باشد. هارمالین، ماده مؤثره اسپند است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. در این مطالعه از مدل موش‌های دیابتی تیپ ۱ برای بررسی خواص هارمالین استفاده شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۴۰ موش نر نژاد NMRI استفاده شد. موش‌ها به ۵ گروه هشت‌تایی شامل کنترل (دریافت‌کننده آب و غذای معمولی)، دیابتی (موش‌هایی که با استرپتوزوتوسین دیابتی شدند)، شم (موش‌های دیابتی‌شده که در طی مراحل آزمایش فقط حلال هارمالین یعنی آب مقطر دریافت کردند)، گروه‌های تجربی ۱ (هارمالین ۵۰mg/kg) و ۲ (هارمالین ۱۰۰mg/kg) تقسیم شدند. پس از اتمام دوره تیمار، حیوانات به‌وسیله اتر بیهوش شدند و خونگیری از همه گروه‌ها انجام شد. میزان گلوکز، انسولین، کلسترول، HDL، LDL، مالون دی‌آلدئید، آنزیم‌های سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز در سرم خون همه گروه‌ها موردسنجش قرار گرفت. با استفاده از روش وسترن‌بلات از بافت پانکراس گروه‌های مختلف به‌منظور سنجش تغییرات انسولین نمونه‌برداری انجام شد.

نتایج: میزان انسولین، HDL، سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز در گروه‌های تیمارشده افزایش معنی‌داری داشت و میزان گلوکز، MDA، LDL و کلسترول در گروه‌های تیمارشده کاهش معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: تیمار موش‌های دیابتی‌شده با هارمالین، می‌تواند باعث بهبود شرایط موش‌های دیابتی شود.

واژگان کلیدی: هارمالین، آنتی‌اکسیدانت، دیابت، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و پنجم، شماره ۶، بهمن - اسفند ۱۴۰۰، صفحات ۱۳۰۲-۱۲۹۴

مقدمه

دیابت شیرین را می‌توان به چند نوع طبقه‌بندی کرد، ولی دو نوع اصلی آن تیپ ۱ و تیپ ۲ می‌باشد. دیابت تیپ ۱ نتیجه اختلالی است که با تخریب خودایمن سلول‌های بتا در پانکراس تعریف می‌شود. به‌نظر می‌رسد که عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد این نوع دیابت نقش مهمّی دارند. دیابت تیپ ۲ یک سندرم اختلال متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین است که میلیون‌ها نفر از مردم دنیا به آن مبتلا می‌باشند.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و فناوری‌های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**

تهران، انتهای بزرگراه شهید ستاری، بلوار شهدای حصارک، میدان دانشگاه، واحد علوم و تحقیقات، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵

تلفن: ۰۹۱۲۴۵۹۵۳۰۲ **دورنویس:** ۰۲۱۴۴۸۶۵۷۶۷

پست الکترونیک: h-jafary@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۱۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۴۰۰/۸/۱۲

دیابت تیپ ۲ یک بیماری متابولیکی پیچیده است که اغلب در ابتدای سنّ بزرگسالی شروع می‌شود و با عوامل ژنتیکی، التهابی و شاخصه‌هایی مانند چاقی، رژیم نامتعادل و بی‌تحرکی در ارتباط است. دیابت نوع ۲ می‌تواند به‌دلیل عوامل متعدد از مقاومت بافت‌های محیطی به انسولین تا عملکرد ناصحیح سلول‌های بتا به‌دلیل مرگ سلول‌های بتای پانکراسی باشد [۱]. در دیابت تیپ ۱ سلول‌های بتای پانکراس که وظیفه ساختن انسولین را دارند، به‌طور کامل از بین رفته یا غیرفعال می‌شوند [۲]. حدود ده درصد از مبتلایان به دیابت را مبتلایان به دیابت تیپ ۱ و نود درصد را مبتلایان به دیابت تیپ ۲ تشکیل می‌دهند. در تحقیقات به‌دست‌آمده، مشاهده شده است که دیابت باعث ایجاد عوارضی از جمله استرس اکسیداتیو، پایین آمدن سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب اکسیداتیو DNA می‌شود [۳]. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل گلوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسیددسموتاز، کاتالاز در خون مبتلایان به دیابت کاهش می‌یابد [۴]. با در نظر گرفتن نقش استرس اکسیداتیو در روند پیشرفت بیماری دیابت، این‌طور به‌نظر می‌رسد که ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو در این بیماران به‌علت تولید گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن در پلاسمای خون و همچنین تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد [۵].

بعضی از گیاهان دارویی و ماده مؤثره آن‌ها اثرات بسیار قابل‌توجهی در کاهش میزان قند مبتلایان داشته است. یکی از گیاهانی که به‌نظر می‌رسد در این زمینه می‌تواند اثربخش باشد، گیاه اسپند است [۶]. گیاه اسپند با نام علمی *Peganum harmala* L. و نام انگلیسی African rue از خانواده Zygophylaceae می‌باشد [۷]. عصاره اسپند به‌علت دارابودن ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در روند بهبود بیماری دیابت مؤثر باشد. از ترکیبات اصلی ریشه و دانه گیاه اسپند می‌توان به خانواده بتا کاربولین‌ها که از آلکالوئیدها می‌باشند و شامل هارمان، هارمین، هارمالین و هارمالول است، اشاره کرد [۸]. هارمالین و هارمین به‌تنهایی ۶۰ درصد از آلکالوئیدهای دانه گیاه اسپند را شامل می‌شوند. نشان داده شده است که عصاره دانه اسپند دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدتوموری و انبساط عروق می‌باشد [۳]. هارمین و هارمالان دارای ظرفیت بالایی در حذف رادیکال‌های آزاد می‌باشند. تأثیر هارمالین در حذف رادیکال‌های آزاد سه برابر بیشتر از هارمین می‌باشد [۹]. در گذشته از گیاه اسپند برای ضدعفونی محیط نیز استفاده می‌کردند [۱۰]، اما این نکته را باید در نظر داشت که مصرف بیش از اندازه عصاره گیاه اسپند دارای عوارض جانبی مانند سقط‌جنین نیز می‌باشد [۱۱]؛ پس استفاده از آن باید کاملاً کنترل‌شده و در مقادیر کم انجام شود [۱۲]. در پژوهش حاضر، اثر هارمالین بر فاکتورهای بیوشیمیایی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش‌های NMRI مبتلا به دیابت نوع ۱ بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کد اخلاق این پژوهش IR.IAU.SRB.REC.1398.119 می‌باشد. در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش بالغ نر نژاد NMRI با وزن تقریبی ۲۰ تا ۲۳ گرم استفاده شد. موش‌ها از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. شرایط نگهداری برای همه موش‌ها یکسان و به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۰°C تا ۲۲°C در نظر گرفته شد. حیوانات به‌طور تصادفی در ۵ گروه ۸ تایی [۱۳]؛ شامل کنترل (فقط آب و غذای معمولی دریافت کردند)، دیابتی (موش‌های دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین که در طی آزمایش آب و غذای معمولی دریافت کردند)، شم (موش‌های دیابتی تیمارشده با آب مقطر که حلال هارمالین می‌باشد به‌مدت ۴ هفته)، ۲ گروه تیمارشده با ۵۰mg/kg و ۱۰۰ mg/kg هارمالین تقسیم شدند. گروه کنترل گروهی بود که تحت تیمار قرار نگرفت و مقایسه آن با گروه‌های تحت تیمار، میزان تأثیر و اثربخشی ماده موردنظر یعنی هارمالین را نشان داد. هارمالین از شرکت سیگما تهیه و برای اثربخشی بهتر، به‌صورت داخل‌صفاقی به موش‌ها تزریق شد. برای ایجاد دیابت در موش‌های NMRI، از تزریق داخل‌صفاقی استرپتوزوتوسین استفاده شد. استرپتوزوتوسین به مقدار mg/kg ۶۵ به موش‌ها تزریق شد [۱۴]. استرپتوزوتوسین سبب ایجاد دیابت تیپ ۱ در موش‌ها می‌شود. علائم دیابت شامل پرنوشی، کاهش وزن و پرادراری بعد از گذشت ۵ تا ۷ روز آشکار شد که به‌منظور اطمینان، بعد از یک هفته، میزان قند خون ازطریق خونگیری از دُم موش و در حالت ناشتایی بعد از ۱۲ ساعت در هنگام صبح اندازه‌گیری شد. پس از القای دیابت، به موش‌های گروه شم، آب مقطر (حلال هارمالین) تزریق شد. به دو گروه تجربی، هارمالین با دو غلظت mg/kg ۵۰ و mg/kg ۱۰۰ به‌صورت داخل‌صفاقی به‌مدت ۴ هفته، روزی یک‌بار، تزریق شد. پس از پایان ۴ هفته، بررسی‌های بیوشیمیایی در حیوانات انجام شد. حیوانات قبل و بعد از تیمار توزین شدند. پس از تمام شدن مدت تیمار با هارمالین، حیوانات بیهوش شدند و از قلبشان به کمک سرنگ انسولین خونگیری انجام شد. به‌دلیل کاهش وزن حیوان بعد از دیابتی شدن، تقریباً ۰/۸ میلی‌لیتر از قلب حیوان خون جمع‌آوری شد. تحقیق انجام‌شده در شرایط کاملاً یکسان و رعایت شرایط استاندارد مطابق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. نمونه‌های خون به‌سرعت در لوله‌ها جمع‌آوری شدند و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) و غلظت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسیددسموتاز (SOD) سرم با استفاده از کیت نوین نوند سلامت موردبررسی قرار گرفت. میزان کلسترول، HDL و LDL با استفاده از کیت پارس آزمون انجام شد. برای ارزیابی انسولین پانکراس، بلافاصله بعد از خونگیری از قلب، نمونه‌های پانکراس از بدن خارج شدند و با بافر فسفات سالین شسته و با استفاده از بافر RIPA لیز شدند. هموژنات به‌دست‌آمده در دمای ۴°C با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری شد و مقدار پروتئین آن با آزمون برادفورد و کیت BCA تعیین شد. پروتئین استخراج‌شده به نسبت ۱:۱ با بافر 2x Laemmeli مخلوط گردید و برای ۵ دقیقه در دمای ۹۵°C قرار گرفت. ۲۵ میکروگرم پروتئین مخلوط‌شده با بافر Laemmeli و ۵ میکرولیتر ladder در ژل ۱۰ درصد SDS-PAGE به‌مدت ۲ ساعت الکتروفورز شد. انتقال پروتئین از ژل به غشای نیتروسلولز به‌صورت ساندویچ در داخل بافر انتقال حاوی متانول انجام شد. مرحله انتقال در دمای ۴°C و برای ۱/۵ ساعت در ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد. جهت اطمینان از وقوع انتقال کامل از رنگ‌آمیزی ژل با

رنگ کوماسی بلو استفاده گردید. عمل بلوک کردن غشا با استفاده از محلول ۱ درصد BSA برای ۱ ساعت انجام گرفت و سپس نیتروسلولز با آنتی‌بادی علیه انسولین (رقت ۱/۱۰۰۰) خریداری شده از شرکت abcam و آنتی‌بادی علیه بتا اکتین (رقت ۲۰۰۰/) مجاور گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C انکوبه شد. شستشوی متوالی غشا با استفاده از بافر TBS انجام گرفت و سپس آنتی‌بادی ثانویه علیه آنتی‌بادی‌های انسولین (HRP anti-mouse) و اکتین (anti-rabbit HRP) با رقت ۱/۲۰۰۰ اضافه گردید و برای ۳ ساعت در تاریکی، در دمای اتاق و بر روی شیکر قرار گرفت. مرحله شستشوی غشا با استفاده از بافر TBS و TBS/T انجام گرفت. بلافاصله پس از شستشو، ۲۰ میکرولیتر از محلول A با ۱ میلی‌لیتر محلول B (کیت وسترن بلات شرکت Roche) مخلوط و بر روی غشا ریخته شد. پس از گذشت ۱ دقیقه عکس‌برداری در اتاق تاریک با فیلم x-ray انجام گرفت. زمان‌های ۱۰ ثانیه، ۱ دقیقه، ۵ دقیقه و ۲۰ دقیقه به‌عنوان زمان در معرض قرارگیری انتخاب شد و فیلم در مجاورت غشا قرار گرفت.

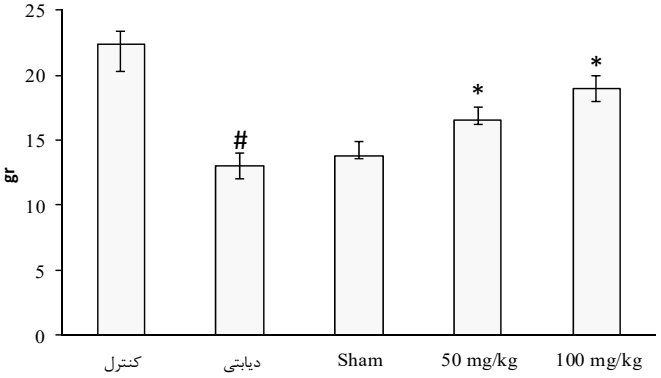
با استفاده از سیستم ظهور و ثبوت، تصاویر ظاهر گشتند و اسکن شدند [۱۵].

آنالیز آماری

تمامی داده‌ها از نظر آماری با استفاده از نرم‌افزار اکسل، Graph Pad Prism و آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way-ANOVA) و آزمون Tukey بررسی شدند. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. اختلاف میان گروه‌ها در سطح (P<۰/۰۵) معنادار در نظر گرفته شد.

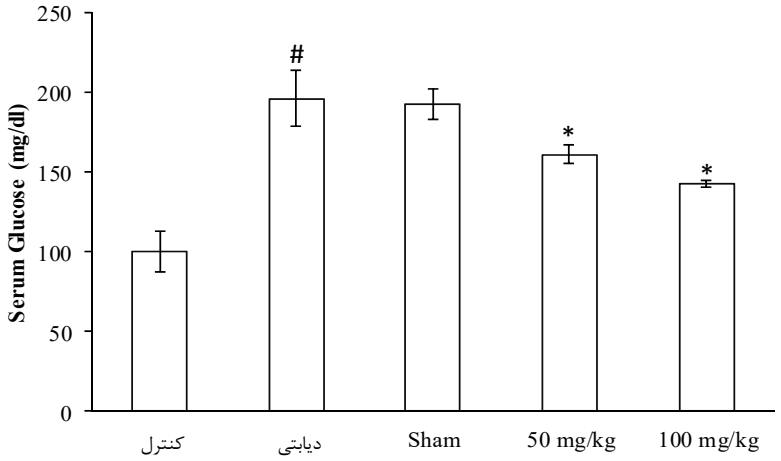
نتایج

در تمام بررسی‌ها با توجه به این‌که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه شم وجود نداشت، گروه‌های تحت‌تیمار با هارمالین، با گروه کنترل مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل آماری پژوهش حاضر، نشان داد که وزن موش‌ها (نمودار شماره ۱) پس از دیابتی‌شدن نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵) و پس از تیمار با هارمالین به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی افزایش پیدا کرد (P<۰/۰۵).



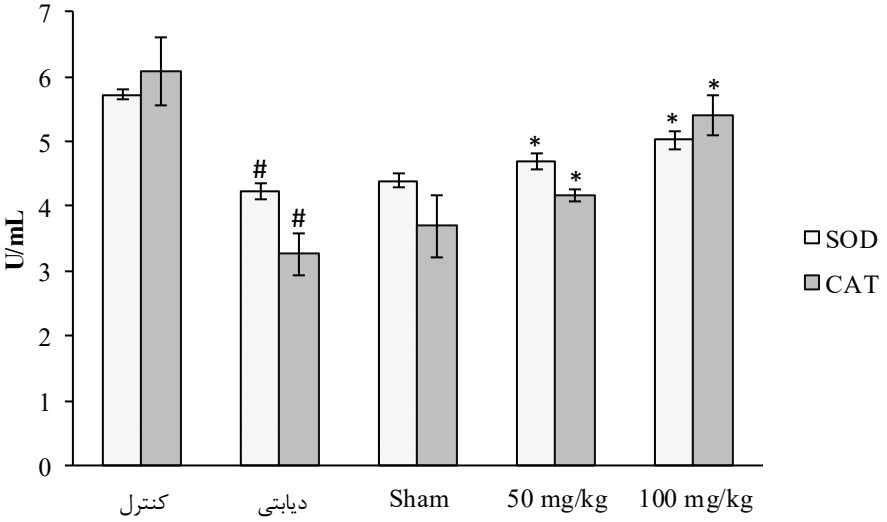
نمودار شماره ۱- نتایج اثر هارمالین در گروه ۱: ۵۰ mg/kg (۱۶/۰±۵/۲) و گروه ۲: ۱۰۰mg/kg (۱۹/۱±۰/۰) بر روی تغییرات وزن در مدل دیابتی (۱۳/۱±۰/۰) موش‌های نر نژاد NMRI. مقایسه بین‌گروهی به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیب Tukey انجام شد. (# مقایسه با گروه کنترل، * مقایسه با گروه دیابتی، سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵))

میزان گلوکز موجود در سرم موش‌ها اندازه‌گیری شد (نمودار شماره ۲). گلوکز در موش‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود (P<۰/۰۵) و تیمار با هر دو دوز ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg هارمالین سبب کاهش معنی‌دار گلوکز نسبت به گروه دیابتی شد (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ۲- نتایج اثر هارمالین در گروه ۱: ۵۰ mg/kg (۱۶۱/۱±۳/۵) و گروه ۲: ۱۰۰mg/kg (۱۴۲/۴±۶/۷) بر روی تغییرات گلوکز در مدل دیابتی (۱۹۶/۳±۵/۶) موش‌های نر نژاد NMRI. مقایسه بین‌گروهی به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیب Tukey انجام شد. (# مقایسه با گروه کنترل، *مقایسه با گروه دیابتی، سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵)

سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز موجود در سرم گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری از خود نشان دادند؛ در حالی‌که بعد از تیمار با هارمالین سطح آنزیم آنتی‌اکسیدان به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کردند (نمودار شماره ۳) (جدول شماره ۱).

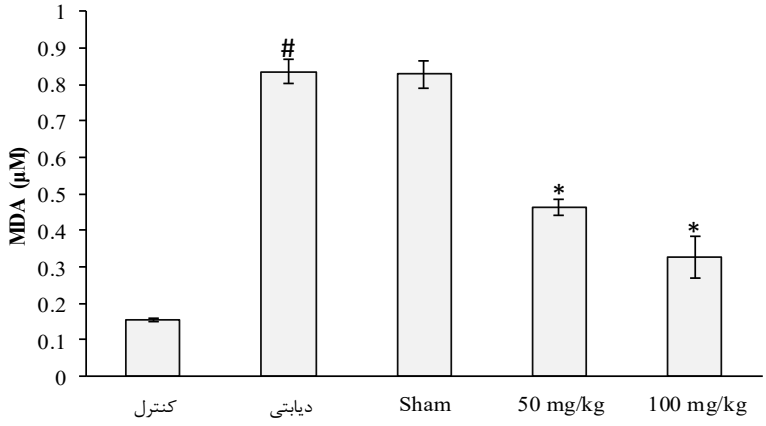


نمودار شماره ۳- نتایج اثر هارمالین (گروه ۱: ۵۰ mg/kg و گروه ۲: ۱۰۰mg/kg) بر روی تغییرات سطح سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز در مدل دیابتی موش‌های نر نژاد NMRI. مقایسه بین‌گروهی به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیب Tukey انجام شد. (# مقایسه با گروه کنترل، *مقایسه با گروه دیابتی، سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵)).

جدول شماره ۱- نتایج تغییرات میزان سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز در گروه‌های موردمطالعه

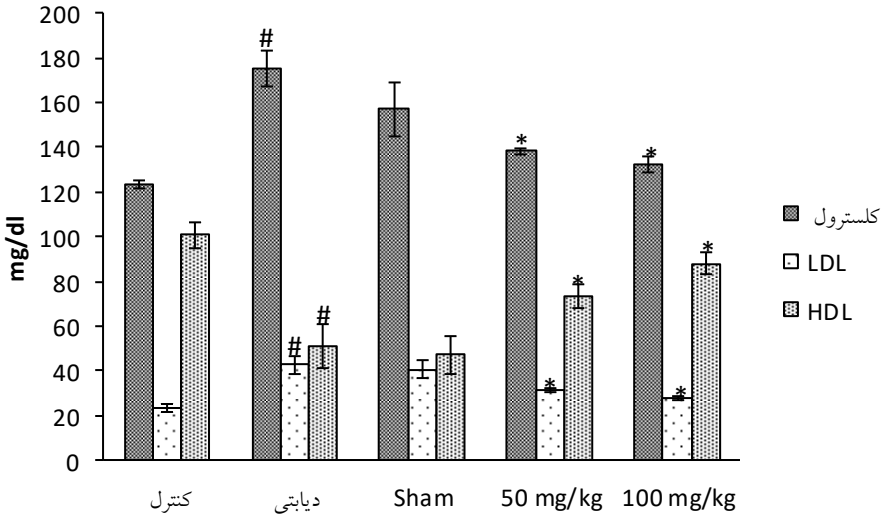
متغیر	گروه کنترل	گروه دیابتی	گروه Sham	گروه ۱ (۵۰mg/kg)	گروه ۲ (۱۰۰ mg/kg)
سوپراکسیددسموتاز (U/mL)	۵/۰±۷۲/۰۸	۴/۰±۲۱/۱۲	۴/۰±۳۹/۱۰	۴/۰±۶۹/۱۱	۵/۰±۰۲/۱۴
کاتالاز (U/mL)	۶/۰±۰۷/۵۲	۳/۰±۲۶/۳۲	۳/۰±۶۹/۴۷	۴/۰±۱۷/۰۹	۵/۰±۴۰/۳۲

همان‌طور که در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است، سطح MDA سرمی در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بعد از تیمار با هارمالین مقدار آن در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه دیابتی کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ۴- نتایج اثر هارمالین (گروه ۱: ۵۰ mg/kg و گروه ۲: ۱۰۰mg/kg) برروی تغییرات سطح MDA سرمی در مدل دیابتی موش‌های نر نژاد NMRI. مقایسه بین‌گروهی به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. (#مقایسه با گروه کنترل، *مقایسه با گروه دیابتی، سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵)).

نتایج به‌دست‌آمده از پروفایل لیپیدی نشان داد که سطح کلسترول و LDL در گروه دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است، درحالی‌که سطح HDL به‌طور معنی‌داری در این گروه کاهش پیدا کرده است. بعد از تیمار با هارمالین، سطح کلسترول و LDL به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی کاهش و سطح HDL نیز به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرده است (نمودار شماره ۵).

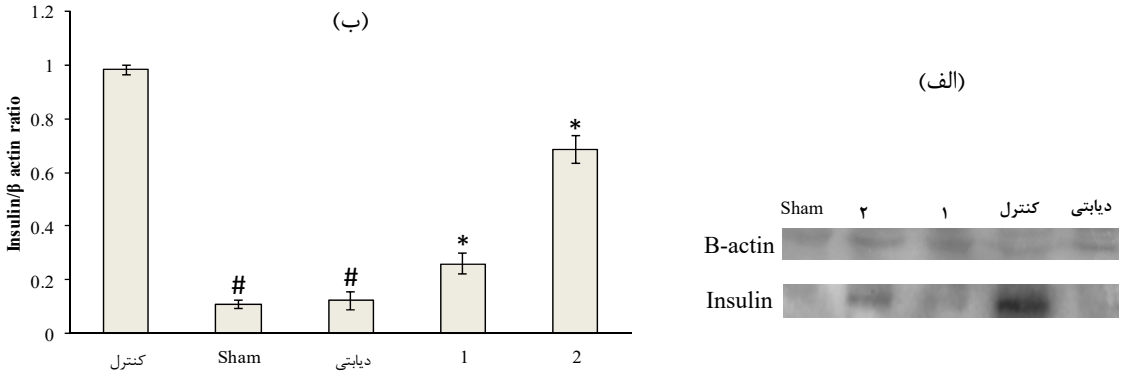


نمودار شماره ۵- نتایج اثر هارمالین (گروه ۱: ۵۰ mg/kg و گروه ۲: ۱۰۰mg/kg) برروی تغییرات سطح کلسترول، LDL و HDL در مدل دیابتی موش‌های نر نژاد NMRI. مقایسه بین‌گروهی به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. (#مقایسه با گروه کنترل، * مقایسه با گروه دیابتی، سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵)).

جدول شماره ۲- نتایج تغییرات میزان MDA، HDL، LDL و کلسترول در گروه‌های موردمطالعه

متغیر	گروه کنترل	گروه دیابتی	گروه Sham	گروه ۱ (۵۰mg / kg)	گروه ۲ (۱۰۰ mg / kg)
MDA (µM)	۰/۰±۱۵۶/۰۰۵	۰/۰±۸۳۵/۰۳۲	۰/۰±۸۲۸/۰۳۷	۰/۰±۴۶۳/۰۲۰	۰/۰±۳۲۷/۰۵۶
HDL (mg/dl)	۱۰۰/۶±۶/۱	۵۱/۹±۰/۶	۴۷/۸±۰/۵	۷۳/۴±۳/۹	۸۸/۴±۰/۵
LDL (mg/dl)	۲۳/۱±۳/۵	۴۲/۴±۶/۰	۴۰/۳±۶/۷	۳۱/۰±۳/۵	۲۸/۱±۱/۰
کلسترول (mg/dl)	۱۲۳/۱±۳/۵	۱۷۵/۸±۶/۱	۱۵۷/۱۲±۰/۰	۱۳۸/۱±۳/۵	۱۳۲/۳±۰/۴

میزان انسولین بافت پانکراسی نسبت به بتا - اکتین با استفاده از روش وسترن‌بلات و نرم‌افزار Image j موردبررسی قرار گرفت. داده‌های به‌دست‌آمده همان‌طور که در نمودار شماره ۶ نشان داده شده است، نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار در سطح انسولین در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل می‌باشد ($P<۰/۰۵$)، درحالی‌که بعد از تیمار با هارمالین، میزان انسولین در گروه‌های تیمارشده نسبت به گروه دیابتی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<۰/۰۵$).



نمودار شماره ۶- نتایج اثر هارمالین بر روی تغییرات سطح انسولین به بتا - اکتین در مدل دیابتی موش‌های نر نژاد NMRI. الف) تصویر وسترن بلات گروه‌های کنترل، دیابتی، Sham، گروه ۱ تیمار با هارمالین (۵۰mg/kg) و گروه ۲ تیمار با هارمالین (۱۰۰ mg/kg) نشان می‌دهد که ضخامت باند انسولین در گروه‌های تیمارشده با هارمالین نسبت به گروه دیابتی و Sham افزایش یافته است. ب) نمودار حاصل از بررسی مقدار انسولین نسبت به اکتین در گروه‌های مختلف نشان داد که نسبت انسولین به اکتین در گروه‌های تیمارشده با هارمالین نسبت به گروه دیابتی و Sham افزایش معنی‌داری پیدا کرده است. تحلیل آماری داده‌های وسترن‌بلات توسط Graph Pad Prism صورت گرفت. مقایسه بین‌گروهی به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. (#مقایسه با گروه کنترل، *مقایسه با گروه دیابتی، سطح معنی‌داری ($P<۰/۰۵$)).

بحث

دیابت، احتمالاً یکی از جدی‌ترین بیماری‌های متابولیکی می‌باشد که در جهان با سرعت در حال گسترش است. شناخت هرچه بهتر این بیماری متابولیکی می‌تواند به درمان سریع آن کمک کند. امروزه از داروهای شیمیایی برای درمان و یا تخفیف علائم دیابت استفاده می‌شود که البته دارای عوارض جانبی نیز می‌باشند. از این‌رو، استفاده از گیاهان دارویی و ماده مؤثره آن‌ها روز به روز در حال توسعه و گسترش است. در طب سنتی، از عصاره گیاهان متعددی برای کاهش قند خون استفاده می‌شود. عمده ترکیبات شیمیایی گیاهانی که سبب کاهش قند خون می‌شود، آلکالوئیدها، ویتامین‌ها، ترپن‌ها، گلیکوزیدها و ساپونین‌ها می‌باشند که برخی از آن‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. آنتی‌اکسیدان‌ها در زندگی جانداران از جمله انسان نقش مهم و اساسی ایفا می‌کنند، به‌طوری‌که مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها با کاهش خطر بیماری‌های قلبی، دیابت و دیگر بیماری‌های مرتبط با پیری مانند سرطان همراه است. در پژوهش حاضر، موش‌های نر نژاد NMRI با استفاده از استرپتوزوتوسین دیابتی شدند. استرپتوزوتوسین می‌تواند به کمک ناقل گلوکز وارد سلول بتا شود و منجر به آلکیلاسیون DNA و درنهایت سبب تخریب سلول‌های بتا شود. موش‌های دیابتی‌شده، تحت تیمار با هارمالین (با دو غلظت ۵۰ mg/kg و ۱۰۰ mg/kg) قرار گرفتند. نتایج تیمار گروه دیابتی با دو غلظت هارمالین به مدت ۴ هفته نشان داد که میزان انسولین موجود در خون آن‌ها نسبت به گروه دیابتی و Sham افزایش معنی‌داری پیدا کرده است و میزان قند در گروه‌های تیمارشده کاهش معنی‌داری یافته است. در تحقیقات نشان داده شده است که اثر هیپوگلیسمیک برخی از گیاهان دارویی درنتیجه تغییر در فعالیت آنزیم‌های گلوکوکیناز کبد و هگزوکیناز می‌تواند می‌باشد. پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده است که تیمار مدل‌های حیوانی دیابتی با ماده مؤثره گیاهان می‌تواند تغییراتی در فعالیت گلوکز ۶-فسفاتاز، گلیکوژن سنتاز [۱۶] و گلیکوژن فسفریلاز ایجاد نماید [۱۷]. افزایش سطح سرمی قند خون در موش‌های دیابتی سبب افزایش سطح گونه‌های آزاد اکسیژن و درنتیجه افزایش استرس اکسیداتیو می‌گردد. با این‌حال در بدن جانداران مکانیسم‌های سیستم دفاعی آنزیمی نظیر کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو وجود دارد تا بتواند از آسیب‌هایی که استرس اکسیداتیو به سلول‌ها وارد می‌کند، جلوگیری کند. تاکنون تحقیقاتی در زمینه بررسی عصاره

گیاه اسپند بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شده است. Singh و همکارانش در سال ۲۰۰۸ از عصاره الکلی دانه‌های اسپند برای کاهش میزان قند در موش‌های دیابتی استفاده کردند [۱۸]. همچنین Singh و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با استفاده از تأثیر 4-hydroxypipecolic acid که از عصاره الکلی دانه اسپند به‌دست آورده بودند، برروی موش‌های C57bl/KsJ-db/db دیابتی نشان دادند که میزان قند خون به‌طور چشمگیری کاهش پیدا کرد و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز افزایش پیدا کرده است [۱۹]. تحقیقات کمیلی و همکارانش در سال ۲۰۱۶ مشخص کرد که نشانه‌های دیابت پس از گاواژ رت‌های نر دیابتی نژاد ویستار با عصاره الکلی اسپند به شدت کاهش می‌یابد [۲۰]. هارمالین از دسته آلکالوئیدهای موجود در عصاره گیاه اسپند است که در غلظت‌های بسیار کم دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [۲۱]. آلکالوئید هارمالین سبب کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌واسطه فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌اش و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر کاتالاز و سوپراکسیددسموتاز می‌شود. در این تحقیق، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز موش‌های دیابتی تیمارشده با هارمالین افزایش معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی و Sham نشان داد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و درنتیجه کاهش پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش MDA می‌شود. رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌توانند برروی لیپید، پروتئین و DNA اثر گذارند ولی حساسیت لیپیدها نسبت به بقیه مولکول‌های زیستی بیشتر است. در این پژوهش، میزان MDA سرم در گروه‌های تیمارشده با هارمالین نسبت به گروه دیابتی و Sham کاهش معنی‌داری نشان داد. تعیین غلظت MDA یکی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو می‌باشد که در بسیاری از مطالعات مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. آنتی‌اکسیدان‌ها با مکانیسم‌های مختلف سبب خنثی‌شدن گونه‌های فعال آزاد اکسیژن می‌شوند. هارمالین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود نیز می‌تواند سبب کاهش گونه‌های فعال آزاد اکسیژن و درنتیجه کاهش میزان MDA شود. در این مطالعه میزان کلسترول، HDL و LDL در همه گروه‌ها ارزیابی شد. میزان کلسترول و LDL در موش‌های تیمارشده با هارمالین نسبت به گروه دیابتی و Sham کاهش معنی‌دار و میزان HDL در گروه‌های تیمارشده افزایش معنی‌دار پیدا کرد. در موش‌های دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین، فعالیت آنزیم لیپوپروتئین لیپاز کاهش می‌یابد، بنابراین احتمالاً هارمالین ازطریق تأثیر بر این سیستم می‌تواند سبب افزایش HDL و کاهش کلسترول و LDL شود [۲۲]. تحقیقات نشان داده است که آلکالوئیدها با اثر بر پروتئین کینازها [۲۳] و یا اسید چرب سنتتاز [۲۴] می‌توانند از ساخت کلسترول و یا LDL نیز جلوگیری کنند [۲۳]. مطالعات بیشتری برای بررسی مکانیسم دقیق عملکرد هارمالین و نیز عوارض جانبی آن موردنیاز است و پیشنهاد می‌شود که مطالعات برروی مسیر سیگنالینگ هارمالین نیز انجام شود تا روند دقیق مکانیسم تأثیر هارمالین بر روند کاهش مقدار قند خون را مشخص کند.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که هارمالین به‌واسطه تأثیر و افزایش میزان آنزیم‌های مؤثر آنتی‌اکسیدانی، کاهش قند خون، تأثیر مثبت در پروفایل لیپیدی و افزایش میزان هورمون انسولین در موش‌های مدل دیابت تیپ ۱ درراستای کاهش اثرات منفی دیابت عمل می‌کند و عوارض ناشی از این بیماری را کاهش می‌دهد و بهبود می‌بخشد. به دلیل شیوع بیماری دیابت و اثرات مخربی که در سلامت و سبک زندگی فرد بیمار می‌گذارد، مشتقات گیاه اسپند از جمله هارمالین احتمالاً می‌تواند در آینده گزینه مناسبی برای کاهش اثرات دیابت باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوشیمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران می‌باشد که با حمایت‌های معنوی و مالی حوزه معاونت محترم پژوهشی آن واحد به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از کمک و یاری این عزیزان قدردانی و تشکر می‌شود.

References:

[1] Ling S, Zaccardi F, Lawson C, Seidu SI, Davies MJ, Khunti K. Glucose Control, Sulfonylureas, and Insulin Treatment in Elderly People With Type 2 Diabetes and Risk of Severe Hypoglycemia and Death: An Observational Study. ***Diabetes Care*** 2021; 44(4): 915-24.

[2] Dashora U, Patel DC, Gregory R, Winocour P, Dhatariya K, Rowles S, Macklin A, et al. Association of British Clinical Diabetologists (ABCD) and Diabetes UK joint position statement and recommendations on the use of sodium-glucose cotransporter inhibitors with insulin for treatment of

type 1 diabetes (Updated October 2020). ***Diabet Med*** 2021; 38(2): e14458.
[3] Khan FA, Maalik A, Iqbal Z, Malik I. Recent pharmacological developments in beta-carboline alkaloid "harmaline". ***Eur J Pharmacol*** 2013; 721(1-3): 391-94
[4] Nafisi S, Bonsaii M, Maali P, Khalilzadeh MA, Manouchehri F. Beta-carboline alkaloids bind DNA. ***J Photochem Photobiol*** 2010; 100(2): 84-91.
[5] Astulla A, Zaima K, Matsuno Y, Hirasawa Y, Ekasari W, Widyawaruyanti A, et al. Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. ***J Nat Med*** 2008; 62(4): 470-72.
[6] Bensalem S, Soubhye J, Aldib I, Bournine L, Nguyen AT, Vanhaeverbeek M, et al. Inhibition of myeloperoxidase activity by the alkaloids of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae). ***J Ethnopharmacol*** 2014; 154(2): 361-69.
[7] El Gendy MA, Somayaji V, El-Kadi AO. *Peganum harmala* L. is a candidate herbal plant for preventing dioxin mediated effects. ***Planta Med*** 2010; 76(7): 671-77.
[8] Herraiz T, Gonzalez D, Ancin-Azpilicueta C, Aran VJ, Guillen H. Beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). ***Food Chem Toxicol*** 2010; 48(3): 839-45.
[9] Berrougui H, Isabelle M, Cloutier M, Hmamouchi M, Khalil A. Protective effects of *Peganum harmala* L. extract, harmine and harmaline against huma n low-density lipoprotein oxidation. ***J Pharma Pharmacol*** 2006; 58(7): 967-74
[10] El-Saad El-Rifaie M. Peganum harmala: its use in certain dermatoses. ***Int J Dermatol*** 1980; 19(4): 221-22
[11] Kartal M, Altun ML, Kurucu S. HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. ***J Pharm Biomed Anal*** 2003; 31(2): 263-69.
[12] Mina CN, Farzaei MH, Gholamreza A. Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review. ***J Tradit Chin Med*** 2015; 35(1): 104-9.
[13] Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. ***ILAR J*** 2002; 43(4): 207-13.
[14] Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS, Gastineau DA, Hiddinga HJ, Jahangir A, et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. ***Lab Anim*** 2011; 45(3): 131-40.
[15] Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. ***Methods Enzymol*** 2009; 463: 573-99.
[16] Von Wilamowitz-Moellendorff A, Hunter RW, Garcia-Rocha M, Kang L, Lopez-Soldado I, Lantier L, et al. Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis. ***Diabetes*** 2013; 62(12): 4070-82.
[17] Kim GY, Lee YM, Cho JH, Pan CJ, Jun HS, Springer DA, et al. Mice expressing reduced levels of hepatic glucose-6-phosphatase-alpha activity do not develop age-related insulin resistance or obesity. ***Hum Mol Genet*** 2015; 24(18): 5115-25.
[18] Singh AB, Chaturvedi JP, Narender T, Srivastava AK. Preliminary studies on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* L. Seeds ethanol extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats. ***Indian J Clinl Biochem*** 2008; 23(4): 391-93.
[19] Singh AB, Khaliq T, Chaturvedi JP, Narender T, Srivastava AK. Anti-diabetic and anti-oxidative effects of 4-hydroxypipecolic acid in C57BL/KsJ-db/db mice. ***Hum Exp Toxicol*** 2012; 31(1): 57-65.
[20] Komeili G, Hashemi M, Bameri-Niafar M. Evaluation of Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of *Peganum harmala* Seeds in Diabetic Rats. ***Cholesterol*** 2016; 2016: 7389864.
[21] Wang C, Zhang Z, Wang Y, He X. Cytotoxic Constituents and Mechanism from *Peganum harmala*. ***Chem Biodivers*** 2016; 13(7): 961-68.
[22] Sreelatha S, Inbavalli R. Antioxidant, antihyperglycemic, and antihyperlipidemic effects of Coriandrum sativum leaf and stem in alloxan-induced diabetic rats. ***J Food Sci*** 2012; 77(7): 119-23.
[23] Elansary HO, Szopa A, Kubica P, Ekiert H, Al-Mana FA, El-Shafei AA. Polyphenols of *Frangula alnus* and *Peganum harmala* Leaves and Associated Biological Activities. ***Plants*** 2020; 9(9): 1086.
[24] Hadadi Z, Nematzadeh GA, Ghahari S. A study on the antioxidant and antimicrobial activities in the chloroformic and methanolic extracts of 6 important medicinal plants collected from North of Iran. ***BMC Chem*** 2020; 14(1): 33.