

## تأثیر عصاره آبی-الکلی شقایق کوهی (*Glaucium flavum*) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی قلب و مغز موش‌های صحرایی دیابتی شده با آلوکسان

آمنه خوشوقتی (PhD)<sup>۱</sup>، غلامحسین دریا (PhD)<sup>۲\*</sup>، فرید هاشمی (DVM)<sup>۳</sup>، مهشاد کلانتری (MSc)<sup>۴</sup>، کیاوش هوشمند (PhD)<sup>۵</sup>

- ۱- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
- ۲- گروه علوم بیومدیkal مقایسه‌ای، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
- ۴- گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی، تهران، ایران
- ۵- گروه اپیدمیولوژی و بیماری‌های مشترک، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۷/۱۲/۱۵، اصلاح: ۹۸/۳/۵، پذیرش: ۹۸/۴/۱۹

### خلاصه

**سابقه و هدف:** استرس اکسیداتیو حلقه وصل دیابت با اختلالات نوروپاتی و میکروواسکولار می‌باشد. در این مطالعه اثر عصاره آبی- اتانولی شقایق کوهی بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی قلب و مغز موش‌های صحرایی هدف ارزیابی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار به طور تصادفی به چهار گروه ۸ تایی، شاهد سالم، شاهد دیابتی، دیابتی تیمار با عصاره شقایق کوهی با دوز ۵۰۰ mg/kg و دیابتی تیمار با داروی گلین کلامید به دوز ۵ μg/kg تقسیم شدند. دیابت با تزریق تک دوز آلوکسان به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم القا گردید. پس از گذشت یک ماه فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز قلبی و مغزی اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** فعالیت قلبی هر سه آنزیم در گروه دیابتی+عصاره به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد دیابتی افزایش نشان می‌داد ( $P < 0.001$ ). فعالیت مغزی سوپراکسید دیسموتاز در گروه دیابتی+عصاره ( $8.79 \pm 1.4$ ) به طور معنی‌داری نسبت به گروه دیابتی+دارو ( $6.77 \pm 1.7$ ) بیشتر بود ( $P = 0.03$ )، همچنین، فعالیت کاتالاز در گروه دیابتی+عصاره ( $4.64 \pm 1.2$ ) مجدداً نسبت به گروه دیابتی+دارو ( $3.83 \pm 1.5$ ) افزایش یافت ( $P = 0.001$ )، مشابه با دو حالت قبل فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز در گروه دیابتی+عصاره ( $4.23 \pm 0.7$ ) به طور معنی‌داری از گروه دیابتی+دارو ( $3.64 \pm 0.4$ ) بالاتر بود ( $P = 0.03$ ).

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که عصاره شقایق کوهی احتمالاً می‌تواند مکانیسم‌های عمده محافظتی بافت‌های قلب و مغز را در مقابل استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت ارتقاء بخشد. همچنین اثر عصاره در مجموع از اثر دارو گلین کلامید موفقیت آمیزتر بوده و این اثر مثبت در بافت مغز آشکارتر بوده است.

**واژگان کلیدی:** دیابت، شقایق کوهی، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز، موش صحرایی، آلوکسان.

### مقدمه

بیماری دیابت مجموعه‌ای از اختلالات پیچیده مرتبط متابولیسمی بوده که با واسطه استرس‌های اکسیداتیو موجب عوارض متابولیکی حاد نظیر کتواسیدوز، اختلالات قلبی عروقی و عوارض مزمن نظیر نوروپاتی می‌شود (۱). افزایش گلوکز خون به نوبه خود، شروع یک سری از واکنش‌های آبخاری را القاء می‌کند که در نهایت منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد از جمله رادیکال آزاد اکسیژن در خون و بافت‌های گوناگون بدن می‌شود این ترکیبات به علت داشتن قدرت واکنش شیمیایی بالا موجب صدمات سلولی و بافتی می‌شوند (۲). از مهم‌ترین عوارض ناشی از دیابت شیرین نوروپاتی دیابتی است که این آسیب هم در اعصاب محیطی و هم در سیستم عصبی مرکزی روی می‌دهد. از مشخصه‌های اصلی آسیب عصبی در حین دیابت، اختلال در عملکردهای شناختی، صدمه به حافظه و کاهش یادگیری است. یافته‌های اخیر در حیوانات آزمایشگاهی مبتلا به دیابت نوع اول نشان می‌دهد که هیپرگلیسمی منجر به اختلال در حافظه و یادگیری می‌شود (۳)؛ همچنین کاهش

میزان آستانه درد و به دنبال آن تخریب فیبرهای عصبی میلین‌دار و غیرمیلین‌دار از صدمات دیگر دیابت می‌باشد که می‌تواند باعث کاهش کیفیت زندگی این افراد گردد (۴). همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که دیابت نقش مهمی در هایپرترافی کاردیومیوپاتی‌ها و القای مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) آنها داشته که این واقعه در طی افزایش استرس اکسیداتیو با واسطه سایتوکاین‌های التهابی واقع می‌شود (۵). مضاف بر این، رسوب پروتئین‌های ماتریکس اکستراسلولار و تشکیل فیبروز میان بافتی و دور عروقی از دیگر پیامدهای آن است (۶). سلول‌ها در مقابل رادیکال‌های آزاد بویژه رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) توسط چندین ترکیب آنتی‌اکسیدانی از جمله گلوکاتایون، ویتامین E، ویتامین C و آنزیم‌هایی مانند گلوکاتایون S-ترانسفراز (Glutathione S-transferase; GST)، سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase; SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (Glutathione Peroxidase; GPx)

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۵۱۵۲۵۸۹۰۴۱۰۰۵ دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون می‌باشد.

\* مسئول مقاله: دکتر غلامحسین دریا

آدرس: شیراز، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، گروه علوم بیومدیkal مقایسه‌ای. تلفن: ۰۷۱-۳۳۲۰۵۴۷۱

کیلوگرم بر حسب وزن بدن (دیابتی+عصاره) و دیابتی تیمار با داروی گلین کلامید به دوز روزانه  $5 \mu\text{g/kg}$  (دیابتی+دارو) تقسیم شدند (۱۵ و ۱۶). گروه‌های ۲ تا ۴ با تزریق آلوکسان دیابتی شدند.

**جمع‌آوری گیاه:** نمونه‌های گیاه شقایق کوهی در اوایل فصل بهار از مراتع اطراف شهرستان کازرون جمع‌آوری شدند. اندام‌های هوایی و گل‌های گیاه بعد از خشک شدن در مجاورت تابش نور در آسیاب برقی پودر گردیده و جهت تهیه عصاره به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پودر حاصله را به نسبت ۵۰/۵۰ با آب و الکل اتانول ۹۶ درصد و به مدت ۷۲ ساعت خیسانده و سپس آن را صاف نموده و در مرحله آخر در آون با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد تا آب و الکل تبخیر گردد. عصاره حاصل به منظور مصرف خوراکی با سرم فیزیولوژی ترکیب و سوسپانسیون حاصل به صورت روزانه با کمک گاواژ به حیوانات خوراندن می‌شد (۱۷). قرص‌های تجاری گلین کلامید (ناژو، ایران) نیز با کمک هاون پودر شده و در سرم فیزیولوژی تیترا شده با PH حدود ۶ حل گردید تا به مصرف خوراکی حیوانات برسد (۱۸).

**روش القای دیابت تجربی:** با هدف افزایش اثر آلوکسان، هشت ساعت قبل از تزریق دارو حیوانات با دسترسی آزاد به آب در گرسنگی قرار گرفتند. القای دیابت با کمک تزریق تک دوز داخل صفاقی ۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم ماده آلوکسان منوهیدرات (Sigma Alderich، آمریکا) انجام گرفت (۱۹). سپس خون‌گیری از انتهای دم انجام شد تا از دیابتی شدن آنها اطمینان حاصل شود. تایید ابتلاء به دیابت با انجام تست قند خون با کمک دستگاه گلوکومتر (Easygluco، کره جنوبی) صورت پذیرفت. ارقام بالاتر از ۲۵۰ میلی گرم بر دسی‌لیتر به عنوان دیابتی تلقی شد (۱۷). **نمونه‌گیری و آزمایش‌های بیوشیمیایی:** در پایان آزمایش حیوانات با اثر بیهوش و نمونه‌های قلب و مغز آنها خارج گردید. سپس ضمن خارج‌سازی خون موجود در بافت‌های هدف، وزن مساوی از هر کدام جدا شده، بر روی یخ با کمک دستگاه هموژنایزر (Edmund Buhler، آلمان) هموژنیزه شد؛ در ادامه با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Sigma، آمریکا) در دور  $18000 \times G$  و به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی استحصال گردید. برای اندازه‌گیری پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از آلبومین سرم گاو (BSA) به دست آمد (۲۰). فعالیت کاتالاز با استفاده از روش Aebi با دنبال نمودن تجزیه پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر series cecil 2040، انگلیس) اندازه‌گیری شد (۲۱). فعالیت آنزیم‌های GPX و SOD عصاره بافتی با استفاده از کیت‌های شرکت رندوکس (کیت‌های Randox، انگلیس) بر اساس دستور العمل کیت‌ها و با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج‌های به ترتیب ۳۴۰ نانومتر و ۵۶۰ نانومتر و بر حسب واحد بر میلی گرم پروتئین تعیین گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری، آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و تست تعقیبی tukey برای آنزیم‌ها و آنالیز واریانس چندطرفه (MANOVA) برای گلوکز خون در نرم‌افزار SPSS ۲۰ صورت پذیرفت.  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

**گلوکز خون:** در گروه دیابتی تیمار با عصاره، تفاوت میانگین‌های بدست آمده طی روزهای اول  $273/6 \pm 22/04$  و پانزدهم  $259 \pm 35/07$  تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما در مقایسه روزهای اول و سی‌ام  $217/25 \pm 11/98$  کاهش معنی‌داری مشاهده گردید

(GPX) و کاتالاز (Catalase; CAT) 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 (۷). در حال حاضر با در نظر گرفتن عوارض جانبی داروهای صنعتی، توجه محققان به‌سوی استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات دارویی با منشأ گیاهی جلب شده است (۸). گیاه شقایق کوهی از سرده شقایق با نام علمی (*Glaucium flavum*) گونه‌ای از تیره شقایقیان (Papaveraceae) می‌باشد که در فصل بهار می‌روید و به دلیل اهمیت دارویی و اقتصادی مورد توجه می‌باشد.

از جمله مصارف درمانی این گیاه می‌توان به درمان آبسه دندان، آنژین، آسم، برونشیت، سیاه سرفه و بی‌خوابی اشاره کرد (۹ و ۱۰). شناخته شده‌ترین ترکیبات این گیاه آلکالوئیدهای هستند که از آن جمله می‌توان به آپورفین (Aporphine)، پروتوپین (Protopine) و پروتوبربرین (Protoberberine) اشاره کرد. در این میان گلوکسین (Glaucine) از زیر خانواده آپورفین به عنوان مهم‌ترین ترکیب آلکالوئیدی آن قلمداد می‌شود (۱۱). از ترکیبات آلکالوئیدی این گیاه به طور گسترده در صنعت داروسازی به عنوان مسکن، ضداحتقان و ضدسرفه بهره‌برداری می‌شود (۱۰). تاکید بر خواص آنتی‌اکسیدانی این گیاه با آشکار شدن خواص ضد ویروسی و ضدسرطانی آن تقویت شده است (۱۳ و ۱۲). گیاه فوق‌الذکر که در مناطق جنوبی ایران در میان محلی‌ها با نام "کلاتین" بوده و کاهش عوارض دیابت مورد مصرف قرار می‌گیرد. ضمن آنکه قابلیت کاهندگی قند خون برای این دارو در خرگوش‌های سالم به صورت علمی مطالعه و مورد تایید قرار گرفته بود (۱۴).

آلوکسان یکی از آنالوگ‌های سمی گلوکز است که با انتقال توسط گیرنده ناقل گلوکز شماره ۲ (Glucose Transporter 2; GLUT2) سلول‌های بتای پانکراس، درون سلول‌ها مجتمع شده و در حضور تیول‌ها باعث ایجاد گروه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شود. این گروه‌ها با تولید رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروژن پراکسید باعث مرگ سلولی می‌شوند. شواهد اخیر حاصل از مطالعات مروری، افزایش استرس‌های اکسیداتیو را مقارن کاهش سطح عملکرد ویتامین‌ها و آنزیم‌های سرکوب‌کننده این عوامل مخرب چه در نوع یک و چه در نوع دو دیابت به اثبات رسانده‌اند (۲). از آنجائیکه تاکنون مطالعه‌ای به منظور بررسی آثار احتمالی عصاره خوراکی گیاهی شقایق کوهی بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی قلب و مغز انجام نشده است. این مطالعه به منظور تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی-اتانولی گیاه شقایق کوهی در مغز و قلب موش‌های صحرایی نر بالغ مبتلا به دیابت القایی با آلوکسان در مقایسه با داروی تجاری و مرسوم گلین کلامید انجام شد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون با کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC. ۱۳۹۸.۰۴۹ بر روی ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ انجام شد. حیوانات در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون خریداری شده و در آزمایشگاه حیوانات مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی شاهد سالم، شاهد دیابتی، دیابتی تیمار با عصاره به دوز ۵۰۰ میلی گرم بر

کاهش معنی داری در گروه تیمار با دارو نسبت به گروه تیمار با عصاره مشاهده شد ( $P=0/003$ ). نهایتاً در روز سی ام، غلظت گلوکز در دو گروه دیابتی تیمار با عصاره و دیابتی تیمار با دارو معنی دار نبود.

**سوپراکسید دیسموتاز (SOD):** میزان SOD بافت قلبی در مقایسه گروه دیابتی+عصاره  $17/05 \pm 0/9$  و شاهد دیابتی  $12/86 \pm 2/5$  افزایش معنی داری مشاهده گردید ( $P<0/001$ ). اما در مقایسه دو گروه دیابتی+عصاره و دیابتی+دارو  $18/22 \pm 1/2$  تفاوت معنی داری مشاهده نگردید (جدول ۱). در بافت مغز، در مقایسه گروه شاهد دیابتی  $(3/44 \pm 1/47)$  و دیابتی+عصاره  $(8/79 \pm 1/4)$  افزایش فعالیت معنی داری نشان داده شد ( $P<0/001$ ). نهایتاً، گروه تجربی دیابتی+عصاره نسبت به گروه دیابتی+دارو  $(6/77 \pm 1/7)$  به طور معنی داری فعالیت بیشتری را به ثبت رسانده بود ( $P=0/03$ ) (جدول ۱).

**کاتالاز (CAT):** در بافت قلب، فعالیت این آنزیم در مقایسه گروه شاهد دیابتی  $(11/82 \pm 1/92)$  با هر دو گروه دیابتی+عصاره  $(16/16 \pm 1)$  و دیابتی+دارو  $(16/57 \pm 1/5)$  تفاوت معنی داری داشت ( $P=0/001$ ). اما از مقایسه دو گروه تجربی دیابتی+عصاره و دیابتی+دارو تفاوت معنی داری گزارش نگردید. در بافت مغز، فعالیت آنزیم کاتالاز، در مقایسه هر دو گروه دیابتی تیمار شده یعنی دیابتی+عصاره  $(4/64 \pm 1/12)$  و دیابتی+دارو  $(3/83 \pm 1/5)$  با گروه شاهد دیابتی  $0/88 \pm 0/19$  افزایش فعالیت مشاهده شده برای آنزیم به طور کاملاً معنی داری افزایش داشته است ( $P<0/001$ ). در نهایت، افزایش مشاهده شده برای گروه دیابتی+عصاره به طور معنی داری بیش از گروه دیابتی+دارو ثبت گردید ( $P=0/001$ ) (جدول ۱).

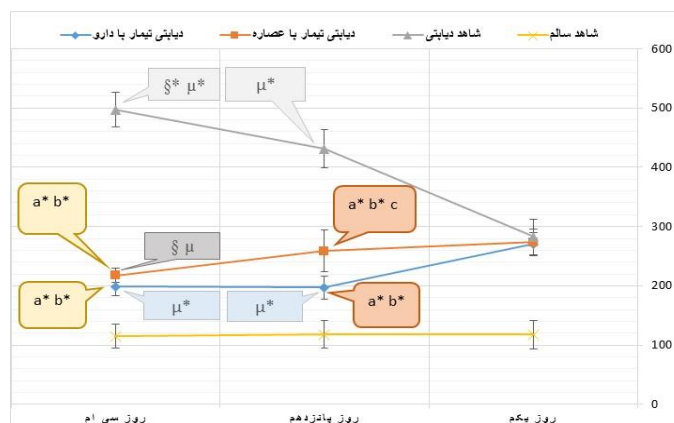
**گلوکوتایون پراکسیداز (GPX):** فعالیت قلبی این آنزیم، در مقایسه گروه شاهد سالم  $(5/64 \pm 1/1)$  با دو گروه دیابتی+عصاره  $(4/25 \pm 0/9)$  و دیابتی+دارو  $(4/05 \pm 0/6)$  معنی دار نبود. اما در مقایسه گروه شاهد دیابتی  $(1/29 \pm 0/68)$  با دو گروه دیابتی+عصاره و دیابتی+دارو تفاوت در سطح معنی دار بود ( $P<0/001$ ). در مقایسه دو گروه تجربی یعنی دیابتی+عصاره و دیابتی+دارو تفاوت معنی دار نبود. در بافت مغز، مقایسه گروه های تجربی از جمله دیابتی+عصاره  $(4/23 \pm 0/7)$  و دیابتی+دارو  $(3/69 \pm 0/4)$  نیز حاکی از معنی دار بودن میانگین گروه تحت تیمار با عصاره نسبت به دارو بود ( $P=0/03$ ) (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوکوتایون پراکسیداز (GPX). در بافت های قلب و مغز موش های صحرایی در چهار گروه ( $n=8$ )

| گروه | شاهد سالم | شاهد دیابتی     | دیابتی تیمار با عصاره (دیابتی+عصاره) | دیابتی تیمار با دارو (دیابتی+دارو) |
|------|-----------|-----------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| بافت | آنزیم     | Mean±SD         | Mean±SD                              | Mean±SD                            |
| قلب  | SOD       | $18/67 \pm 1/4$ | $12/86 \pm 2/5$                      | $17/05 \pm 0/9$                    |
|      | CAT       | $19/01 \pm 0/9$ | $11/82 \pm 1/92$                     | $16/16 \pm 1$                      |
|      | GPX       | $5/64 \pm 1/1$  | $1/29 \pm 0/68$                      | $4/25 \pm 0/9$                     |
| مغز  | SOD       | $10/45 \pm 1/3$ | $3/44 \pm 1/47$                      | $8/79 \pm 1/4$                     |
|      | CAT       | $6/11 \pm 1/1$  | $0/88 \pm 0/19$                      | $3/83 \pm 1/5$                     |
|      | GPX       | $5/14 \pm 0/7$  | $1/27 \pm 0/55$                      | $4/23 \pm 0/7$                     |

آزمون واریانس یک طرفه، حروف لاتین بیان گر تفاوت معنی داری در سطح ( $P<0/05$ ): a: تفاوت معنی دار با گروه شاهد سالم، b: تفاوت معنی دار با گروه شاهد دیابتی، c: تفاوت معنی دار با گروه تیمار با عصاره و علامت \* بیان گر تفاوت معنی داری در سطح ( $P<0/001$ )

( $P=0/02$ )؛ و نیز در مقایسه روزهای پانزدهم و سی ام نیز کاهش معنی دار بود ( $P=0/01$ ). در گروه دیابتی تیمار با داروی گلین کلامید، در مقایسه روز اول  $27/04 \pm 19/7$  و پانزدهم  $19/11 \pm 19/7$  کاهش معنی داری در سطح ثبت شد ( $P<0/001$ ). همچنین در مقایسه روزهای اول و سی ام  $19/87 \pm 15/22$  نیز اختلاف در همین سطح حفظ شد ( $P<0/001$ )؛ حال آنکه در مقایسه دو روز پانزدهم و سی ام تفاوت معنی دار نبود (نمودار ۱).



نمودار ۱. مقایسه میانگین غلظت گلوکز خون برحسب  $mg/dl$  در سه روز اندازه گیری در ۴ گروه ( $n=8$ ).  $\mu$ : تفاوت معنی دار با روز اول در سطح ( $P<0/05$ );  $\S$ : تفاوت معنی دار با روز پانزدهم در سطح ( $P<0/05$ ); همچنین حروف لاتین بیانگر مقایسه میان گروه های تجربی با گروه های شاهد در روزهای مجزا: a: تفاوت معنی دار با گروه شاهد سالم، b: تفاوت معنی دار با گروه شاهد دیابتی، c: تفاوت معنی دار در میان گروه تجربی. \*: تفاوت در معنی دار در سطح ( $P<0/001$ )

در مقایسه میان گروه ها در روز اول، میانگین گروه شاهد سالم به طور معنی داری کمتر از تمامی گروه های دیابتی گزارش گردید ( $P<0/001$ ). در روز پانزدهم، غلظت گلوکز در گروه شاهد دیابتی به طور معنی داری در مقایسه با هر دو گروه دیابتی تیمار با عصاره و دارو بالاتر بود ( $P<0/001$ )؛ در ادامه در مقایسه دو گروه تجربی،

## بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPX در گروه تیمار با عصاره نسبت به گروه شاهد دیابتی مشاهده گردید، که این افزایش بطور کلی در مغز واضح‌تر و بطور ویژه برای آنزیم GPX قابل توجه‌تر بوده است. همچنین، مقایسه میانگین غلظت گلوکز خون بدست آمده از گروه دیابتی تیمار با عصاره شقایق کوهی با گروه شاهد دیابتی و گروه دیابتی تیمار با دارو، خاصیت کاهندگی قندخون در این گیاه را تأیید می‌کند حال آنکه این خاصیت در قیاس با داروی گلیبن‌کلامید از اثر گذاری کم‌تری برخوردار است. این نتایج با مطالعه Cabo و همکاران مطابقت دارد (۱۴).

در توضیح این مشاهده می‌توان به مطالعه Gyurkovska و همکاران اشاره کرد که در پژوهش خود سرکوب مسیر JAK/STAT و سایتوکاین‌های IL-1، IL-6، IL-7، IL-12 و M-CSF و در نتیجه سرکوب التهاب را به گلوکسین استخراج شده از گیاه شقایق کوهی نسبت دادند (۲۲). Gurzov و همکاران نیز اثبات کردند، اختلال در مسیر JAK/STAT در پانکراس، کبد، ماهیچه، و بافت چربی یک عامل مهم در ایجاد چاقی و دیابت می‌باشد (۲۳)؛ همچنین Yoshida و همکاران ضمن مشاهده غلظت بالاتر IL-12 و M-CFS در بیماران دیابتی، این فاکتورها را عامل ایجاد فیروز دیواره عروقی با واسطه ماکروفاژها در این بیماران دانستند (۲۴).

در پژوهشی بر روی موش‌های دیابتی القاء شده با استرپتوزوتوسین (Streptozotocin) نشان داده شد، که میزان مالون دی آلدئید (Malon dialdehyde; MDA) به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو بر اثر دیابت افزایش یافته و تجویز عصاره گیاهی میوه خارخاسک به طور معنی‌داری باعث کاهش میزان MDA و افزایش فعالیت آنزیم SOD بافت مغز موش‌های تیمار شده است (۲۵). از طرف دیگر، تشدید استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی موجب بروز عوارض در بیماری‌های متابولیک نظیر دیابت قندی شده و در نهایت منتهی به نوروپاتی و نورودژنراسیون می‌گردد (۲۶). در مطالعه حاضر نیز این اثر به خوبی در مغز گروه شاهد دیابتی شده دیده شد. ولی با تیمار حیوانات توسط عصاره شقایق کوهی این اثر تعدیل گردید. با توجه به وجود ترکیبات آلکالوئیدی و

آنتی‌اکسیدانی گیاه شقایق کوهی می‌توان احتمال افزایش آنزیم‌های GPX، SOD و CAT را در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره ۵۰۰ تجویز کرد (۱۳ و ۱۲). در یک مطالعه نیز تجویز ویتامین E بعنوان آنتی‌اکسیدان به خوبی توانست این اثر را در بافت مغز تعدیل کند (۲۷).

در مطالعه حاضر در بافت قلب موش‌های شاهد دیابتی، میزان فعالیت هر سه آنزیم به طور قابل توجهی کاهش داشت. این یافته با نتایج مشابهی از سوی Tanoorsaz و همکاران، Doustar و همکاران و Kandhare و همکاران حمایت شده است (۲۸-۳۰). نشان داده شده که دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت قلب در طی دیابت به شدت تحت الشعاع قرار گرفته و سرکوب می‌شود (۳۱). محققان این پدیده که خود مقدمه‌ای بر آپوپتوز سلول‌های قلبی است را محصول وقوع فرآیند التهابی با حضور سایتوکاین‌هایی نظیر IL-1، TNF- $\alpha$  و IFN- $\gamma$  می‌دانند (۳۲). اما در مقایسه نتایج گروه‌های تحت درمان با عصاره مشاهده گردید که، اثر محافظتی عصاره شقایق کوهی با داروی گلیبن‌کلامید برابری می‌کرد که این نتیجه با مطالعه Shirpoor و همکاران بر روی اثر محافظتی و آنتی‌اکسیدانی ویتامین E علیه آپوپتوز ناشی از دیابت بر بافت قلب موش‌های صحرایی مطابقت دارد (۳۳). از طرفی Mohamadifard و همکاران در مقایسه‌ای میان گیاهان خاکشیر، زرشک و سیلیمارین اعلام نمودند که سیلیمارین از خانواده فلاونوئیدها در خواص آنتی‌اکسیدانی از مابقی برتر بوده است (۳۴). از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که، تجویز عصاره شقایق کوهی در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خود به طور قطع با کاهش غلظت گلوکز خون و احتمالاً با سرکوب التهاب به کاهش استرس اکسیداتیو و تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مغز و قلب موش‌های دیابتی کمک می‌نماید.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، پرسنل بخش تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه و تمام افرادی که در اجرای این تحقیق یاری رسان بودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

# The Effect of Hydroalcoholic Extract of Glaucium Flavum on the Activity of Anti Oxidative Enzymes in the Heart and Brain of Alloxan Induced Diabetic Rats

A. Khoshvaghti (PhD)<sup>1</sup>, Gh. Darya (PhD)<sup>\*2</sup>, F. Hashemi (DVM)<sup>3</sup>, M. Kalantari (MSc)<sup>4</sup>, K. Hushmandi (PhD)<sup>5</sup>

1.Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, I.R.Iran

2.Department of Comparative Biomedical Science, Faculty of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R.Iran

3.Young Researchers and Elite Club, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, I.R.Iran

4.Department of Genetic Science, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Medical science Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R.Iran

5.Department of Epidemiology and Zoonosis, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 21; 2019; PP: 331-37

Received: Mar 6<sup>th</sup> 2019, Revised: May 26<sup>th</sup> 2019, Accepted: July 10<sup>th</sup> 2019.

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Oxidative stress is the connection between diabetes and neuropathies and micro vascular disorders. This study was designed to investigate the effect of hydroalcoholic extract of Glaucium Flavum on the tissue activity of antioxidant enzymes in the heart and brain of Alloxan induced diabetic rats.

**METHODS:** In this experimental study, 32 male rats were randomly divided into four groups of eight including control, diabetic, diabetic rats treated by Glaucium Flavum with dose of 500mg/kg and diabetic rats treated with Glibenclamide 5µg/kg. Diabetes was induced by single injection of 120mg/kg of Alloxan. After one month, activity of SOD, CAT and GPX were measured in the heart and brain tissues and analyzed.

**FINDINGS:** Cardiac activity of all three enzymes in the diabetic + extract group were significantly higher than diabetic control ( $p < 0.001$ ). Activity of SOD in brain had a significant difference in comparison to diabetic + extract ( $8.79 \pm 1.4$ ) and diabetic + drug groups ( $6.77 \pm 1.7$ ) ( $p = 0.03$ ). As the same, CAT activity in diabetic+extract group ( $4.64 \pm 1.2$ ) was significantly higher than diabetic + drug group ( $3.83 \pm 1.5$ ) ( $p < 0.001$ ). Similar to the two previous state, GPX activity in diabetic+extract group ( $4.23 \pm 0.7$ ) was significantly higher than diabetic+drug group ( $3.64 \pm 0.4$ ) ( $p = 0.03$ ).

**CONCLUSION:** The present study declared that yellow Glaucium Flavum extract can promote the main protective enzymatic mechanisms against diabetic induced oxidative stress in heart and brain. In addition, the effect of the extract was more successful than the effect of Glibenclamide and this effect was more pronounced in brain tissue.

**KEY WORDS:** Diabetes Mellitus, Glaucium flavum, Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase, Brain, Heart, Rat, Alloxan.

## Please cite this article as follows:

Khoshvaghti A, Darya Gh, Hashemi F, Kalantari M, Hushmandi K. The Effect of Hydroalcoholic Extract of Glaucium Flavum on the Activity of Anti Oxidative Enzymes in the Heart and Brain of Alloxan Induced Diabetic Rats. J Babol Univ Med Sci. 2019; 21: 331-37.

\*Corresponding Author: Gh. Darya(PhD)

Address: Department of Comparative Biomedical Science, Faculty of Advanced Medical Sciences and Technologies, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, I.R.Iran

Tel: +98 71 32305471

E-mail: ghdarya88@gmail.com

## References

1. Leroith D, Taylor SI, Olefsky JM. Diabetes Mellitus: A Fundamental and Clinical Text, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1485-9.
2. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med*. 2000;17(3):171-80 .
3. Zenker J, Ziegler D, Chrast R. Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. *Trends Neurosci*. 2013; 36(8): 439-49 .
4. Arnold R, Kwai NC, Krishnan AV. Mechanisms of axonal dysfunction in diabetic and uraemic neuropathies. *Clin Neurophysiol*. 2013; 124(11): 2079-90 .
5. Guleria RS, Choudhary R, Tanaka T, Baker KM, Pan J. Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis: Role of the renin-angiotensin system. *J Cel Physiol*. 2011; 226(5): 1292-307 .
6. Remme W. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003; 17(4): 349-60 .
7. 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.
8. Maurya AK, Tripathi S, Ahmed Z, Sahu RK. Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Euphorbia hirta* in streptozotocin induced diabetic rats. *Der Pharm Lettre*. 2012; 4(2): 703-7.
9. Cortijo J, Villagrasa V, Pons R, Berto L, Martí-Cabrera M, Martínez-Losa M, et al. Bronchodilator and anti-inflammatory activities of glaucine: In vitro studies in human airway smooth muscle and polymorphonuclear leukocytes. *Br J Pharmacol*. 1999; 127(7): 1641-51 .
10. Majd A, Mehrabian S, Khanafari A. Evaluating antimicrobial effect of *Glaucium* on Oral microflora. *J Dent Med*. 1996; 9(2): 57-66. [In Persian]
11. Bogdanov MG, Svinjarov I, Keremedchieva R, Sidjimov A. Ionic liquid-supported solid-liquid extraction of bioactive alkaloids. I. New HPLC method for quantitative determination of glaucine in *Glaucium flavum* Cr. (Papaveraceae). *Separ Purifica Tech*. 2012; 97: 221-7.
12. Spasova M, Philipov S, Nikolaeva-Glomb L, Galabov A, Milkova T. Cinnamoyl- and hydroxycinnamoyl amides of glaucine and their antioxidative and antiviral activities. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16(15): 7457-61 .
13. Bournine L, Bensalem S, Peixoto P, Gonzalez A, Maiza-Benabdesselam F, Bedjou F, et al. Revealing the anti-tumoral effect of Algerian *Glaucium flavum* roots against human cancer cells. *Phytomedicine*. 2013; 20(13):1211-8.
14. Cabo J, Cabo P, Jimenez J, Zarzuelo A. *Glaucium flavum* Crantz. Part v: Hypoglycemic activity of the aqueous extract. *Phytotherapy Res*. 1988; 2(4): 198-200 .
15. Kar A, Choudhary B, Bandyopadhyay N. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2003; 84(1): 105-8 .
16. Prince PS, Menon VP, Pari L. Hypoglycaemic activity of *Syzigium cumini* seeds: effect on lipid peroxidation in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 1998; 61(1): 1-7 .
17. Ojo A, Adanlawo I, Ojo O. Ameliorative potentials of Saponins from *Helianthus annuus* roots on hepatoprotective and some kidney function indices of alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacol online*. 2016; 3: 73-9.
18. Tawfeek HM, Roberts M, El Hamd MA, Abdellatif AAH, Younis MA. Glibenclamide Mini-tablets with an Enhanced Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Performance. *AAPS PharmSciTech*. 2018; 19(7): 2948-60.
19. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72(1-2): 248-54 .
21. Aebi H. Catalase. *Methods in Enzymatic Analysis*, Bergmeyer HU (ed.). Verlag Chemie: Weinheim; 1974. p. 105: 673-678.

22. Gyurkovska V, Philipov S, Kostova N, Ivanovska N. Acetylated derivative of glaucine inhibits joint inflammation in collagenase-induced arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2015; 37(1): 56-62 .
23. Gurzov EN, Stanley WJ, Pappas EG, Thomas HE, Gough DJ. The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes. *FEBS J*. 2016; 283(16): 3002-15.
24. Yoshida S, Kobayashi Y, Nakama T, Zhou Y, Ishikawa K, Arita R, et al. Increased expression of M-CSF and IL-13 in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy: implications for M2 macrophage-involving fibrovascular membrane formation. *Br J Ophthalmol*. 2015; 99(5): 629-34.
25. Roghani M, Arbab-Soleymani S. The effect of oral feeding of tribulus terrestris fruit on some markers of oxidative stress in the brain of diabetic rats. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci*. 2013; 21(2): 127-35. [In Persian]
26. Ienco EC, LoGerfo A, Carlesi C, Orsucci D, Ricci G, Mancuso M, et al. Oxidative stress treatment for clinical trials in neurodegenerative diseases. *J Alzheimer's Dis*. 2011; 24(Suppl 2): 111-26.
27. Tahmasebi k, Jafari M, Salehi M. Modulation of Diazinon-Induced Oxidative Stress by Vitamins E and C in rat Brain. *J Guilan Uni Med Sci*. 2017; 26(101): 66-73. [In Persian]
28. Tanoorsaz S, Behpour N, Tadibi V. Investigating the Effect of Mid-Term of Aerobic Exercise on Apoptosis Biomarkers in the Cardiomyocytes of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Fasa Univ Med Sci* 2018, 7(4): 488-97 . [In Persian]
29. Doustar Y, Mohajeri D, Rezaei A. Effect of grape seed extract on cardiomyocyte apoptosis in streptozotocin induced diabetic rats. *MED SCI J ISLAMIC AZAD UNIV*. 2011; 21(3): 168-74 .
30. Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL. Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. *Fitoterapia*. 2012; 83(4): 650-9 .
31. Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik PM, Epstein PN. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. *The Revi Diab Stu*. 2006; 3(3): 108 .
32. Cao JY, Wang H. Role of Fas-FasL in insulinitis in nonobese diabetic mouse. *Chin Med J* 2004; 117(4): 615-17.
33. Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, Ilkhanizadeh B, Pakdel FG, Khademvatani K. Cardioprotective effect of vitamin E: rescues of diabetes-induced cardiac malfunction, oxidative stress, and apoptosis in rat. *J Diabetes Complications*. 2009;23(5):310-6.
34. Mohamadifard M, Nazem H, Mottaghipisheh J. The Effects of Copper Oxide Nanoparticles and Hydroalcoholic Extracts of *Berberis Vulgaris*, *Descurainia Sophia* and *Silybum Marianum* on Catalase, Glutathione Peroxidase, and Malondialdehyde Concentration in Male Diabetic Rats. *J Babol Univ Med Sci*. 2016; 18(3): 54-61. [In Persian]