بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان‌نامه تحصیلی برای دریافت درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش فیزیولوژی جانوری

بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی ،آنتی‌دیابتی وآنتی آپوپتوتیک عصاره متانولی گیاه (*Nepeta assurgens (Lamiaceae*)

مؤلف:

سمیه خالصی

استاد راهنما:

دکتر ایران پورابولی

استاد مشاور:

دکتر سعید اسماعیلی ماهانی

بهمن ماه ۱۳۹۰

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد به

گروه زیست شناسی

دانشکده علوم

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمیشود.

دانشجو : خانم سمیه خالصی

استاد راهنما : خانم دکتر ایران پورابولی

استاد مشاور : آقای دکتر سعید اسماعیلی ماهانی

داور ۱ : آقای دکتر سید منصور میرتاج الدینی

داور ۲ : خانم دکتر نیره عسکری

داور ۳ : -

معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی یا نماینده دانشکده : خانم دکتر شیخ شعاعی

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به:

پدر و مادر و خانواده عزیزم که همواره حامی من در امور زندگی وتحصیل بوده اند.

تشکر و قدردانی:

حمد وسپاس بیکران پروردگار یگانه را که هستی بخشید، نعمت سلامتی عطا فرمود و جان آدمی را فکرت آموخت.

قبل از هر چیز لازم است از استاد گرانمایه ام سرکار خانم دکتر ایران پورابولی به پاس تمامی زحمات و راهنمایی های کار گشای ایشان در طول تحصیل و انجام این رساله نهایت تشکر را داشته باشم .

از استاد مشاورگرامی خود جناب آقای دکتر سعید اسماعیلی ماهانی به پاس راهنمایی های ایشان تقدیر و تشکر فراوان دارم.

از اساتید محترم داور سرکار خانم دکتر نیره عسکری و جناب آقای دکتر منصور میر تاج الدینی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از تمامی پرسنل مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان به ویژه ریاست آن مرکز و همچنین کارشناس محترم آزمایشگاه مولکولی سرکار خانم حاجعلی زاده کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از تمامی همکلاسی های خود در طول دوره تحصیل در دانشگاه شهید باهنر کرمان بخاطر تمامی محبت هایشان سپاسگذارم.

چکیده

دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیکی است که با افزایش گلوکز خون در اثر کمبود میزان انسولین یا مقاومت به عملکرد انسولین یا هر دو شناخته می‌شود. از آن جا که آنتی اکسیدان ها در بهبود بیماری دیابت موثر هستند و گیاهان عمده ترین منابع آنتی اکسیدانی می باشند لذا در این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی دیابتی چند عصاره گیاهی *Nepeta assurgens, Ferula assa foetida*، *Pycnocycla spinosa* مورد بررسی قرار گرفت. اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره های متانولی به صورت *in vitro* با روش‌های دی فنیل پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) و قدرت احیاکنندگی یون آهن (FRAP) مورد مطالعه قرار گرفت. ضمنا تأثیر عصاره ها با دوزهای mg/kg ۱۰۰و۳۰۰ بر تست تحمل گلوکز (OGTT) در موش‌های نرمال بررسی شد. دیابت نوع I با تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) i.p ۶۰ mg/kg در موش های صحرایی نر القا شد.یک هفته بعد از تزریق STZ، موش هایی که FBG آنها بیش از ۳۰۰ mg/dl بود دیابتی محسوب وبه ۳ گروه تقسیم وبه ترتیب گلایبین کلامید ۶۰۰µg/kg و دوز موثرتر عصاره ای که بیش ترین اثر هیپوگلایسمیک را در روش OGTT نشان داد و آب مقطر را از طریق گاواژ به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. در پایان ۱۴ روز، بعد از بیهوشی کامل از حیوانات خونگیری انجام شد. سپس سرم خون به منظور اندازه‌گیری فاکتورهای سرمی گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، کراتینین، ALT، AST جدا شد. نتایج نشان داد که IC_{50} برای عصاره *N. assurgens* در روش DPPH وFRAP (۳/۸۴ mg/ml و ۰/۲۸۰ mg/ml) برای عصاره *F. foetida* (۹/۶ mg/ml و ۱/۰۹۵mg/ml) و برای‌عصاره *P. spinosa* (۶/۶ mg/ml و ۰/۹۲۱ mg/ml) در مقایسه با BHA (کنترل مثبت)(۱/۱۵ mg/ml و ۰/۰۶۲mg/ml) می باشد. نتایج بدست آمده از تست تحمل گلوکز(OGTT) نشان داد که تجویز دوز ۱۰۰mg/kg عصاره *N. assurgens* ۳۰ دقیقه قبل از استفاده گلوکز، درلحظه ۱۲۰ دقیقه به طور معنی‌داری سطح سرمی گلوکز را کاهش داد و سایر گیاهان کاهش معنی داری را در هیچ یک از زمان ها نشان ندادند. همچنین نتایج نشان داد که میانگین سطح سرمی گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، کراتینین و ALT و AST ناشتا در گروه دریافت‌کننده دوز ۱۰۰mg/kg عصاره *N. assurgens* برای ۱۴ روز نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. بنابراین عصاره متانولی گیاه *N. assurgens* دارای اثرات هیپولیپیدمیک و هیپوگلیسمیک می باشد و احتمالا بخشی از اثرات آن به دلیل ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن می باشد.

واژه های کلیدی: *Nepeta assurgens*، آنتی‌اکسیدان، دیابت ملیتوس

پیشگفتار

دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیکی است که با افزایش گلوکز خون در اثر کمبود ترشح انسولین یا مقاومت به عملکرد انسولین یا هر دو شناخته می‌شود. هیپرگلیسمی از نشانه‌های تشخیصی دیابت و فاکتور مهمی در پیشرفت عوارض دیابت همچون رتینوپاتی، بیماری‌های قلبی عروقی، نفروپاتی واختلالات کبدی می‌باشد(Laakso, 1999). همچنین هیپرگلیسمی منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد و ایجاد استرس‌اکسیداتیو می‌شود(Wolff and Dean, 1987). دیابت اغلب با نقص در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و پروتئین‌ها همراه است. درواقع در این بیماری علاوه بر قند، سطح لیپیدهای سرم (تری‌گلیسرید، کلسترول) نیز افزایش می‌یابد. بالا رفتن این فاکتورها می‌تواند خطر بروز بیماری‌های قلبی‌عروقی را بالا ببرد(Grundy et al., 2004). بنابراین لازم است جهت ساخت داروهای جدید و مؤثرتر بر بهبود بیماری دیابت تلاش شود، در دهه‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف از جمله دیابت مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اینکه عصاره متانولی گیاهان *Nepeta assurgens*, *Ferula assa foetida* و *Pycnocycla spinosa* حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می باشند از این‌رو در این تحقیق اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌دیابتی آن ها بررسی شد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱ ـ ۱ - دیابت ملیتوس و انواع آن ۲

۱ ـ ۱ ـ مکانیسم مولکولی التهاب و تخریب سلول های بتا در دیابت نوع ۱..... ۳

۱ ـ ۲ - عوارض دیابت..... ۴

۱ ـ ۲ ـ عوارض قلبی عروقی دیابت ۵

۱ ـ ۲ ـ رتینوپاتی ۷

۱ ـ ۳ ـ نفروپاتی ۷

۱ ـ ۴ ـ نوروپاتی..... ۸

۱ ـ ۵ ـ عوارض کبدی ۹

۱ ـ ۳ - استرس اکسیداتیو و دیابت..... ۱۰

۱ ـ ۴ - گیاهان دارویی و درمان دیابت..... ۱۳

۱-۵-۱- معرفی مشخصات عمومی گیاهان خانواده *Lamiaceae* ۱۴

۱-۵-۲- خواص درمانی و موارد استعمال گونه های مختلف *Nepeta*..... ۱۵

۱-۵-۳- معرفی ترکیبات گونه *Nepeta assurgens* ۱۵

۱-۶-۱- معرفی مشخصات عمومی گیاهان خانواده *Apiaceae* ۱۶

۱-۶-۲- معرفی ترکیبات و خواص درمانی *Ferula assa foetida* ۱۶

۱-۷-۱- معرفی ترکیبات و خواص درمانی *Pycnocycla spinosa* ۱۷

۱-۸- اهداف..... ۱۷

فصل دوم : مواد و روش ها

۲-۱- وسایل مورد استفاده..... ۱۹

۲-۲- مواد مورد استفاده..... ۲۰

۲-۳- بافر مورد استفاده ۲۰

۲-۳-۱- بافر سیترات..... ۲۰

۲-۴- روش تهیه عصاره گیاهی..... ۲۰

۲-۵- بررسی اثر آنتی اکسیدانی عصاره های *N. assurgens*، *P.spinosa*، *F.assa foetida* به صورت in vitro ۲۱

۲-۵-۱- روش DPPH ۲۱

۲-۵-۲- روش FRAP ۲۲

۲-۶- روش انجام تست تحمل گلوکز..... ۲۲

۲-۷- روش القای دیابت..... ۲۳

۲-۸- گروه های حیوانی مورد مطالعه..... ۲۳

۲-۹- آنالیز آماری..... ۲۴

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج حاصل از بررسی اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره متانولی *N. assurgens* بر روی رادیکال DPPH..... ۲۶

۳-۲- نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره *N.assurgenes* با استفاده از روش FRAP ۲۷

۳-۳- نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره متانولی *F.assa foetida* با استفاده از روش DPPH ۲۸

۳- ۴- نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره *F. assa foetida* با استفاده از روش FRAP ۲۹

۳-۵- نتایج حاصل از بررسی اثر مهاری غلظت‌های مختلف عصاره متانولی *p. spinosa* بر روی رادیکال DPPH ۳۰

۳-۶- نتایج حاصل از بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره *p. spinosa* با استفاده از روش FRAP ۳۱

۳-۷- اثر تجویز خوراکی مقادیر (mg/kg ، ۳۰۰ و ۱۰۰) عصاره متانولی *N.assurgenes* بر تست تحمل گلوکز در موش‌های نرمال ۳۲

۳-۸- اثر تجویز خوراکی مقادیر (mg/kg ، ۳۰۰ و ۱۰۰) عصاره متانولی *F.assa foetida.* بر تست تحمل گلوکز در موش‌های نرمال ۳۳

۳-۹- اثر تجویز خوراکی مقادیر (mg/kg ، ۳۰۰ و ۱۰۰) عصاره متانولی *p. spinosa.* بر تست تحمل گلوکز در موش های نرمال ۳۴

۳-۱- نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره متانولی *N. assurgens* و گلایبن کلامید (۶۰۰ µg/kg) به مدت ۱۴ روز بر سطح شاخص های سرم ۳۵

فصل چهارم: بحث ونتیجه گیری

۴-۱- اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره *N. assurgens* ,*F.assa foetida* , *P.spinosa* به صورت *in* vitro ۳۸

۴-۲- دیابت نوع I و تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی سرم..... ۳۹

۴-۳- اثر عصاره متانولی *N. assurgens* بر سطح فاکتورهای بیوشیمیایی سرم در موش‌های دیابتی..... ۴۳

نتیجه گیری کلی..... ۴۶

پیشنهادها..... ۴۷

منابع

منابع..... ۵۰

فهرست شکل ها و نمودارها

شکل۱-۱- نمای ترسیمی متابولیسم بیش از حد گلوکز و فعال شدن مسیرهای بیوشیمیایی آسیب رسان سلول ۶

شکل ۱-۲- استرس اکسیداتیو اختلال میتوکندری ۱۳

نمودار ۳-۱- مقایسه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره متانولی *N. assurgenes* با روش مهار رادیکال DPPH ۲۷

نمودار ۳-۲- مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره *N.assurgens* با روش FRAP ۲۸

نمودار۳-۳- مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره متانولی *F. foetida* با روش مهار رادیکال DPPH ۲۹

نمودار۳- ۴- مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره *F.assa foetida* با روش FRAP ۳۰

نمودار۳-۵ - مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره متانولی *p. spinosa* با روش مهار رادیکال DPPH ۳۱

نمودار۳-۶- مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف از عصاره *p. spinosa* با روش FRAP ۳۲

نمودار ۳-۷- تاثیر دوزهای مختلف عصاره متانولی *N.assurgens* بر تست تحمل گلوکز.... ۳۳

نمودار۳-۸- تاثیر دوزهای مختلف عصاره متانولی *F. foetida* بر تست تحمل گلوکز.. ۳۳

نمودار ۳-۹- تاثیر دوزهای مختلف عصاره متانولی *P. spinosa* بر تست تحمل گلوکز..... ۳۴

نمودار۳-۱۰- مقایسه سطح زیرنمودار OGTT در گیاهان *N. assurgens*، *F.foetida*، *P. spinosa* ۳۵

جدول ۳-۱- مقدار IC_{50} عصاره ها و BHA در دو روش DPPH و FRAP ۳۲

جدول۳-۲- نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره متانولی *N. assurgens* گلایبن کلامید (۶۰۰ µg/kg) به مدت ۱۴ روز بر سطح شاخص های سرم..... ۳۵

فصل اول

کلیات و مروری بر

مطالعات گذشته

۱- مقدمه

۱-۱- دیابت ملیتوس و انواع آن

دیابت ملیتوس نوعی بیماری مزمن غیر واگیر است که بدن قادر به ساخت یا استفاده از انسولین نمی باشد. عامل اصلی دیابت ملیتوس ناشناخته است ولی عوامل مختلفی را به عنوان عامل پیشنهادی ذکر میکنند که عوامل اتوایمیون و عوامل عفونی از جمله این عوامل هستند.دیابت طبق تقسیم بندی سازمان جهانی بهداشت (WHO) و انجمن دیابت آمریکا (ADA) به چهار گروه تقسیم می شود.دیابت نوع ۱ که در گذشته به آن دیابت وابسته به انسولین گفته می شد، در آن تولید انسولین به علت تخریب سلول های بتای لوزلمعده کم بوده یا به طور کلی وجود ندارد، از آنجا که دیابت نوع ۱ بیش از نیمی از بیماران زیر ۱۸ سال را شامل می‌شود به عنوان دیابت جوانان شناخته می‌شود. این بیماری یک نوع اختلال خودایمنی است که درآن لنفوسیت‌های T به طور انتخابی سلول‌های بتای جزایر پانکراس را تخریب می‌نمایند و در نتیجه سطوح انسولین برای حفظ سطوح طبیعی گلوکز پلاسما کفایت نمی‌کند لذا انسولین خارجی احتیاج است تا از مرگ فرد جلوگیری شود. عوارض بلندمدت دیابت شامل رتینوپاتی، نوروپاتی، نفروپاتی و بیماری‌های قلبی عروقی است. این عوارض مرتبط با افزایش التهاب، استرس‌اکسیداتیو و آپوپتوز به واسطه سطوح بالای گلوکز در دیابت می‌باشد (Redondo et al., 2001).

دیابت نوع ۲ که در گذشته به آن دیابت غیر وابسته به انسولین گفته می شد در آن اختلال هم در گیرنده انسولین و هم در فعالیت انسولین وجود دارد .گسترش دیابت نوع ۲ مرتبط با افزایش مقادیر بافت چربی احشایی است. مقاومت به انسولین یکی از جنبه‌های پاتوفیزیولوژیکی چاقی و دیابت نوع ۲ است (Funaki, 2009). مصرف غذاهای پرکالری در جوامع صنعتی باعث ذخیره سازی زیاد چربی اشباع در بافت چربی سفید و هیپرپلازی و هیپرتروفی آدیپوسیت‌ها می‌شود. این آدیپوسیت‌ها، ماکروفاژها را به سمت بافت چربی سفید می‌آورند و با هم پاسخ پیش‌التهابی را آغاز می‌کنند. آزاد شدن این فاکتورهای پیش‌التهابی و اسیدهای چرب اشباع از بافت چربی سفید به داخل عروق، سیگنالینگ انسولین را در بافت‌های غیر از چربی دچار نقص می‌کند که باعث مقاومت به انسولین می‌شود (Funaki, 2009). تجمع اسیدهای چرب اشباع (SFAs[1]) در آدیپوسیت‌ها منجر به فعال کردن پروتئین‌کیناز C می‌شود. PKC، مسیرهای IKK (I-Kappa-B Kinase) و JNK (C-Jun N-terminal kinase) را فعال می‌کند که فسفریلاسیون سرین و تجزیه IRS-1[2] را القا می‌کنند و تولید و ترشح سیتوکین‌های پیش‌التهابی را

[1]. Saturatted fatty acids
[2].Insulin receptor substrate

تحریک می‌کنند (Gao et al., 2004). اسیدهای چرب اشباع، TLR4 (Toll-Like receptor 4) روی سطح آدیپوسیت‌ها را فعال می‌کنند که مسیر NF-KB و JNK را فعال کرده و سیگنالینگ انسولین را مختل می‌کنند(Song et al., 2006). دیابت نوع ۲ به طور معمول با کمک رژیم غذایی مناسب، فعالیت بدنی کافی و داروهای خوراکی کاهنده قند خون درمان می شود و در برخی موارد برای دستیابی به کنترل مطلوب نیاز به انسولین درمانی است. دیابت نوع ۳ که تحت عنوان دیابت ثانویه نامیده می شود و جزو مواردی است که اختلال ژنتیکی در فعالیت سلول های بتای لوزالمعده، فعالیت مولکول انسولین و در برخی موارد دیگر اختلال هورمونی یا عوارض ناشی از داروها در آن دیده می شود. دیابت نوع ۴ دیابت حاملگی است که برای اولین بار در زمان حاملگی تشخیص داده می شود (Zimmet et al., 2001).

۱-۱-۱- مکانیسم مولکولی التهاب و تخریب سلول‌های بتا و ایجاد دیابت نوع ۱

دیابت نوع ۱ بوسیله کمبود انسولین در نتیجه تخریب مزمن و پیشرونده سلول‌های بتای پانکراس به وسیله سیستم ایمنی ایجاد می‌شود. دیابت نوع ۱ یک بیماری چندین فاکتوری است که در آن یک پیش‌زمینه ژنتیکی همراه با عوامل محیطی فعالیت تخریب خودایمنی سلول‌های بتای پانکراس را القاء می‌کند(Jahromi and Eisenbarth, 2007). چندین لوکوس که خطر پیشرفت این بیماری را افزایش می‌دهند شناخته شده‌اند. در این میان، لوکوس HLA به مراتب بیشترین پلی‌مورفیسمی است که زمینه ابتلا به این بیماری را مهیا می‌کند. دیگر لوکوس‌ها شامل لوکوس انسولین، CTLA4، PTPN22، ERBB3، PTPN11 و TRAFD1 می‌باشند (Todd et al., 2007). همه این لوکوس‌ها مرتبط با سیستم ایمنی است و خطر خودایمنی را افزایش می‌دهد. لوکوس HLA شامل ژنهایی است که مولکول‌های کمپلکس سازگاری بافتی اصلی (MHC) را به رمز در می‌آورد(Turner, 2004). بیشترین زمینه ژنتیکی برای دیابت نوع ۱ مرتبط با پلی‌مورفیسم‌های ویژه از فرم‌های DQ و DR از مولکول‌های MHC Class II می‌باشد (Jahromi and Eisenbarth, 2007). حضور آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های سلول بتا اغلب ماهها یا سال‌ها قبل از ظهور علائم کلینیکی این بیماری تشخیص داده می‌شود (Pihoker et al., 2005) . خودایمنی که در نهایت منجر به مرگ سلول‌های بتای جزایر پانکراس می‌شود به این ترتیب است که ابتدا APCs[3] (ماکروفاژها) به جزایر پانکراس نفوذ می‌کنند (Yoon and Jun, 2005). این سلول‌ها از طریق ظهور آنتی‌ژن‌های سلول بتا روی

[3]. Antigen Peresenting Cells

مولکول‌های MHC Class II خودشان ، منجر به فعال شدن سلول‌های +Th0 CD4 می‌شوند و با ترشح اینترلوکین ۱۲ باعث تمایز آنها به +Th1 CD4 می‌شوند. سلول‌های +Th1 CD4 با ترشح سیتوکین‌ها نظیر IL-1ß، TNF-α و رادیکال‌های آزاد نظیر NO باعث مهاجرت سلول‌های T سیتوتوکسیک +CD8 به درون جزایر و تحریک سلول‌های بتا جهت آزادسازی کموکین‌ها جهت جذب و فعالیت بیشتر سلول‌های ایمنی می‌شود (Cardozo et al., 2003). در این پروسه، واکنش-های ایمنی از طریق فرایند آپوپتوز منجر به مرگ سلول‌های بتای جزایر پانکراس می-شوند (Cnop et al., 2005). مکانیسم‌های تخریب سلول‌های بتای جزایر پانکراس افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ شامل: ۱) بیان لیگاند Fas (FasL) و گیرنده آن در سلول‌های +CD8 و سلول-های بتای جزایر پانکراس ۲) ترشح سیتوکین‌ها شامل IL-1ß، TNF-α و IFN-γ توسط سلول-های ایمنی که به درون جزایر نفوذ کرده‌اند ۳) تولید گونه‌های باز فعال اکسیژن مثل NO (Eizirik and Mandrup- poulsen, 2001). این سیتوکین‌های التهابی باعث فعال شدن پروتئین کینازهای مختلف (IKK[4]، MAPK[5]، TRAF6[6]) می شوند. در نهایت این پروتئین‌کینازها منجر به فعالیت فاکتور هسته ای NF-kB می‌شود که وارد هسته می شود و بر رونویسی ژن های سیتوکین های التهابی (IFN-γ، IL-1β و TNF-α) اثر گذاشته و سیتوکین های التهابی به عنوان لیگاند، باعث آپوپتوز و نکروز سلول‌های بتا می‌شوند (Yoon and Jun, 2005).

۱-۲- عوارض دیابت

دیابت یک اختلال متابولیکی است که عملکرد سیستم‌های مختلف بدن را تحت تأثیر قرار می-دهد. هایپرگلیسمیا فاکتور مهمی در پیشرفت عوارض دیابت نوع ۱و ۲ است و از طریق تشکیل محصولات گلیکولاسیون (AGEs[7])، افزایش دی آسیل گلیسرول، افزایش استرس اکسیداتیو، فعالیت پروتئین کیناز C در گسترش عوارض دیابت است (Yamagishi et al., 2006).

عوارض دیابت به دو دسته عروقی و غیرعروقی تقسیم می‌شوند. عوارض عروقی شامل ماکروواسکولار (عروق کرونری، عروق مغزی و بیماری های رگی محیطی) و میکروواسکولار (رتینوپاتی، نفروپاتی، نروپاتی و عوارض قلبی-عروقی) می‌شوند. عوارض غیرعروقی نیز شامل ناتوانی جنسی، امبریوپاتی، تغییرات پوستی و تغییرات خلقی می‌شوند (Laakso, 1999).

---

4. IKB Kinase
5. Mitogen activated protein kinase
6. TNF- receptor- associated factor-6
7. Advanced Glycated End Products

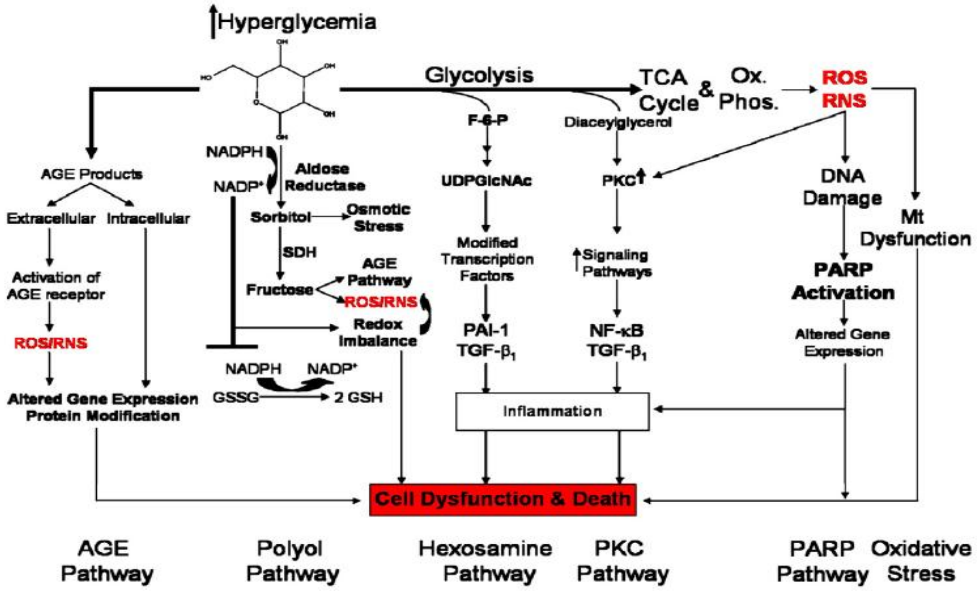
۱-۲-۱- عوارض قلبی -عروقی دیابت

افزایش سطح گلوکز در بیماری دیابت منجر به عوارض قلبی عروقی شده که مهمترین عامل مرگ و میر در دیابت نوع ۱ و ۲ می باشد (Caprio et al., 1997). عوارض عروقی دیابت میکرو آنژیوپاتی و ماکروآنژیوپاتی را شامل می شود. میکروآنژیوپاتی که سبب سرعت بخشیدن به آترواسکلروزیس می شود شامل عروق کرونری ومغزی می شود (Ruderman et al., 1992). ماکروآنژیوپاتی در دیابت شامل آترواسکلروزیس شدید در عروق کرونر،کاروتید و شریان های محیطی و در نتیجه افزایش خطر ابتلا به انفارکتوس میوکارد و سکته مغزی در بیماران دیابتی می شود (Duby et al., 2004).

در بیماران دیابتی به دلیل ترشح ناکافی انسولین، اثر انسولین در ذخیره چربی معکوس می شود.آنزیم لیپاز حساس به هورمون در سلول های چربی فعال شده ،ضمن هیدرولیز تری گلیسیریدهای ذخیره شده موجب رهایش اسیدهای چرب و گلیسرول به داخل گردش خون می شود. افزایش اسیدهای چرب در پلاسما موجب پیش برد تبدیل اسیدهای چرب به فسفولیپیدها و کلسترول می شود و گاهی در غیاب انسولین لیپوپروئتئین های پلاسما تا سه برابر افزایش می یابد. غلظت بالای لیپیدها و به ویژه کلسترول پیدایش آترواسکلروزیس را تشدید می نماید (Aruoma et al., 2006). هایپر گلایسمی و افزایش درون سلولی گلوکز در سلول های رگی منجر به افزایش سوربیتول از طریق مسیر پلی ال می شود. آنزیم آلدوز ردکتاز[۸] (AR)، گلوکز را به سوربیتول احیا می‌کند و سوربیتول دهیدروژناز[۹] (SDH) نیز سوربیتول را به فروکتوز اکسید می‌کند .هر دوی این آنزیم‌ها در بافت‌هایی که به عوارض دیابت دچار هستند به مقدار زیادی بیان می‌شوند.

۸. Aldose Reductase
۹. Sorbitol dehydrogenase

افزایش سوربیتول باعث افزایش تونیسیته سلول شده و باعث می شود برخی مواد مثل میو-اینوزیتول[10] (که در انتقال سیگنال‌های سلولی مهم هستند) و تورین[11] (نوعی آنتی‌اکسیدان داخلی) از سلول خارج شوند . این فرایندها باعث افزایش استرس اکسیداتیو درسلول می شوند (Feldman et al., 1997). تشکیل فروکتوز، گلی‌کاسیون وابسته به NADPH را پیشرفت می‌دهد. این فرایند باعث برهم خوردن بیشتر تعادل ظرفیت اکسیداسیون و احیا سلول می‌شود (Thornalley, 2005).



شکل۱-۱. نمای ترسیمی متابولیسم بیش از حد گلوکز و فعال شدن مسیرهای بیوشیمیایی آسیب رسان سلولی. متعاقب متابولیسم بیش از حد گلوکز، استرس اکسیداتیو ایجاد شده و به میتوکندری آسیب وارد می‌گردد. همراه شدن استرس اکسیداتیو و فعال شدن مسیرهای مضر AGE، Hexosamine، PARP و PKC باعث ناهماهنگی ظرفیت اکسیداسیون و احیا سلولی، اختلال بیان ژن و استرس اکسیداتیو بیشتر و بیشتری می‌شود. همچنین این مسیر-ها باعث القای التهاب و اختلال عصبی می‌گردند (Edwards et al., 2008).

NF-κB: Nuclear factor kappa B; PARP: Poly(ADP-ribose) polymerase; PKC: Protein kinase C; AGE: Advanced glycation endproducts; RNS: Reactive nitrogen species; ROS: Reactive oxygen species, GSH: glutathione; GSSG: oxidized glutathione; UDPGlcNAc: UDP-N- Acetyl glucosamine; VEGF: Vascular endothelial growth factor

[10]. Myo-inositol/MI
[11]. Toaurine

۱-۲-۲-رتینوپاتی

هایپرگلایسمیای مزمن بواسطه اختلالات متابولیکی باعث رتینوپاتی می شود. رتینو پاتی دیابت به واسطه افزایش نفوذپذیری رگ، رشد رگ های خونی جدید در شبکیه و سطح خلفی زجاجیه و مسدود شدن عروق صورت می گیرد (Ruderman et al., 1992). افزایش فعالیت مسیر سوربیتول وهمچنین فعال شدن آلدوز ردکتاز ممکن است تشکیل دی آسیل گلیسرول را بیشتر کند که خود احتمال فعال شدن مسیر مضر پروتئین‌کیناز C را افزایش می‌دهد (Jermendy et al., 1991; Uehara et al., 2004). تولید زیاد از حد ایزوفرم PKC-β بطور خاص باعث افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF)، PAI-1، NF-Kb و TGF-β می‌گردد (Arikawa et al., 2007). فاکتور رشد اندوتلیال رگی در ایجاد عروق جدید داخل چشمی و پرولیفراسیون نقش اساسی دارد (Elliot et al., 1994).

مطالعات نشان داده اند که سطح VEGF در موارد فعال بیماری بیشتر از حالت غیر فعال است (Chen et al., 1994). ایسکمی شبکیه ناشی از انسداد مویرگ یک نقش حیاتی در گسترش رتینوپاتی دیابتی دارد. MCP-1[۱۲] متعلق به خانواده کموکین‌ها است که یک عملکرد کموتاکتیک برای مونوسیت‌ها دارد و سطوح MCP-1 زجاجیه در رتینوپاتی دیابتی افزایش می‌یابد (Schroder et al., 1991).

۱-۲-۳- نفروپاتی

نفروپاتی دیابتی یکی از عوامل مهم مرگ افراد دیابتی محسوب می شود .نفروپاتی از دیدگاه آسیب شناسی در افراد دیابتی به وسیله ضخیم شدن غشای پایه گلومرولار به وسیله توسعه ماتریکس خارج سلولی در نواحی مزانژیال و فیلتراسیون بالای گلومرول مشخص می شود (Osterby et al., 1990). غلظت گلوکز بالا به طور مستقیم استرس اکسیداتیو را در سلول های مزانشیم گلومرولار افزایش می دهد.این استرس همچنین بیان mRNA مربوط به ژن های NF-kB و تولید پروتئین‌های التهابی TGF-B ، فیبرونکتین، لامینین، الاستین، IL-1 و IL-6 را القا می کند.که منجر به آسیب توبولار کلیه میگردد (Ha and Kin, 1999).

در طی دیابت غلظت متابولیت هایی از قبیل اوره،اسید اوریک،کراتینین و یون ها در ادرار افزایش می یابد (Shokeen et al., 2008). تولید زیاد رادیکال های آزاد سبب فعال شدن سیستم گزانتین اکسیداز می شود این سیستم سبب تولید اسید اوریک شده و هم چنین فعال شدن این سیستم سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید و افزایش میزان کلسترول و تری گلیسرید سرم می

[12]. Monocyte chemotactic protein-1

گردد.علاوه بر این گلیکولاسیون پروتئین ها در افراد دیابتی منجر به افزایش پورین می گردد و پورین نیز منبع اصلی تولید اسید اوریک بوده و منجر به فعال شدن سیستم گزانتین اکسیداز می شود (Anwar et al., 2003). آنتی اکسیدان ها اثرات مفیدی روی ساختار غشای قاعده ای مویرگ های گلومرولار و کاهش ضخامت غشای قاعده ای در موش های دیابتی دارند (Afshari et al., 2007).

۱-۲-۴- نوروپاتی

نوروپاتی یک عارضه شایع و زیان آور در هر دو دیابت نوع یک و نوع دو می‌باشد. شیوع نوروپاتی در بیمارانی که به تازگی به دیابت مبتلا شده‌اند ۸ درصد و در کسانی که به مدت طولانی به این بیماری مبتلا بوده‌اند تا ۵۰ درصد می باشد. شواهد زیادی نشان می‌دهند که حتی مراحل اولیه ابتلا به دیابت نیز با بعضی انواع نوروپاتی همراه می‌باشد (Boulton et al., 2005).

نوروپاتی دیابتی یک مفهوم توصیفی است که طیفی از سندرم‌های کلینیکی با پراکندگی متفاوت آناتومیکی، دوره‌ای و احتمالاً متفاوت در مکانیسم‌های بیولوژیک را در بر می‌گیرد. این سندرم‌ها به صورت نوروپاتی منتشر[۱۳] یا متمرکز[۱۴] (کانونی) در اعصاب پیکری محیطی یا فیبر-های اعصاب اتونوم رخ می‌دهند (Edwards et al., 2008). چندین علت برای انواع سندرم‌های نوروپاتی دیابتی در بیماران با قند خون بالا شناسایی شده است. هایپرگلایسمی به عنوان عنصر اصلی پیدایش و پیشرفت نوروپاتی دیابتی و همینطور عوارض عروق ریز و مویرگ های افراد دیابتی می‌باشد (Edwards et al., 2008).

مسیرهایی که عمدتاً از متابولیسم گلوکز مشتق می شوند عبارتند از: جریان یافتن گلوکز از مسیر پلی‌اُل[۱۵] و مسیر هگزوز آمین[۱۶]؛ فعالیت بیش از حد و نامناسب ایزوفرم‌های پروتئین کینازC و تولید و انباشته شدن فراوان مشتقات قندی داخلی. اگرچه هریک از این مسیرها خود به تنهایی آسیب رسان هستند ولی درمجموع وقتی با هم عمل می‌کنند حالت پایه اکسیداسیون و احیای میتوکندری را برهم زده و از تعادل خارج می‌کنند، درنتیجه باعث تولید بیش از حد گونه‌های واکنشگر اکسیژنی[۱۷] (ROS) می‌شوند. افزایش

---

[13]. Diffuse neuropathy

[14]. Focal neuropathy

[15]. Polyol pathway
[16]. Hexosamin pathway
[17] Reactive Oxygen Species