دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی
گرایش فیزیولوژی جانوری

عنوان

مقایسه اثر متفورمین و عصاره دانه شنبلیله بر اختلالات متابولیکی و هیستولوژیکی و بیان ژن در رت های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین

دانشجو:

ثانیه صالح زاده

اساتید راهنما:

پروفسور رضا حیدری **دکتر فاطمه رحمانی**

استاد مشاور:

دکتر وحید نجاتی

شهریور ۱۳۹۱

حق چاپ وتکثیر مطالب این پایان نامه برای دانشگاه ارومیه محفوظ است

پایان نامه آقای/خانم : ثانیه صالح زاده به تاریخ ۱۳۹۱/۰۷/۱۵ شماره۲۳۰۰ -۲ مورد پذیرش هیات محترم داوران با رتبه عالی و نمره ۱۹/- (به حروف نوزده تا) قرار گرفت.

۱- استاد راهنما و رئیس هیئت داوران: دکتر رضا حیدری

۲-استاد راهنمای دوم: دکتر فاطمه رحمانی

۳- استاد مشاور: دکتر وحید نجاتی

۳- داور خارجی: دکتر مینو ایلخانی پور

۴- داور داخلی: دکتر فرح فرخی

۵- نماینده تحصیلات تکمیلی: دکتر رحیم نادرعلی

تقدیم به پدر و مادرم

نهال را باران بایدتا بشوید غبار نشسته بر برگهایش و سیرابش کند از آب حیات و آفتاب بایدتا بتاباندنیرو راو محکم کندشاخه های تازه روییده را

به نام مادربوسه ای باید زددست هایی را که می‌شویند غبار خستگی روزگار راو سیراب می کنند روح تشنه را

به نام پدربوسه ای باید زددست هایی راکه می تابانندنیرو راو محکم می کنندداستواری پایه‌های زیستن را

پروردگارا:

نه میتوانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شد، سیاه کنم و نه برای دستهای پینه بسته‌شان که ثمره تلاش برای افتخار من است، مرهمی دارم . پس توفیقم ده که هر لحظه شکرگزارشان باشم و ثانیه‌های عمرم را در عصای دست بودنشان بگذرانم.

تقدیرو تشکر

سپاس بیکران پروردگار یکتا را که هستیمان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به هم نشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. به فرمانبرداریش برخود می-دانم که یاری یاران را اجر نهم:

پدر و مادر مهربانم که همواره به قدرت و پشتیبانی از انهاست که راه پیموده ام، بوسه بر دستان پرمهرشان می زنم.

خواهران و برادر عزیزم که در تمامی مراحل زندگی همراهم بوده اند.

اساتید راهنمای عزیزم جناب اقای پروفسور رضا حیدری (استاد راهنمای اول)، خانم دکتر فاطمه رحمانی (استاد راهنمایدوم)،اقای دکتر وحید نجاتی (استاد مشاور) که با صفا و صداقت خویش مرا راهبری کردند کمال تقدیر و تشکر را دارم.

از اساتید ارجمندم ،خانم دکتر ایلخانی پور و دکتر فرخی به پاس قبول زحمت داوری و مطالعه پایان نامه کمال تشکر را دارم و از مساعدت و لطف نماینده تحصیلات تکمیلی جناب اقای دکتر نادر علی قدردانی می کنم.

در پایان از تمامی دوستان و هم کلاسی‌های عزیزم که در انجام پایان نامه مرا یاری کردند نهایت تشکر و قدر دانی می‌کنم واز خداوند بهترین‌ها را برایشان ارزومندم.

چکیده

مقدمه: بیماری دیابت قندی یک بیماری متابولیکی پیچیده است که با اختلال در متابولیسم گلوکز همراه است و چاش جدی برای بهداشت و درمان در سراسر جهان است. باتوجه به اهمیت گیاهان دارویی به دلیل حداقل عارضه جانبی ان‌ها در این تحقیق عصاره دانه شنبلیله برای تعیین خواص انتی‌دیابتیک مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: در این تحقیق ۳۶ موش صحرایی نر بالغ با محدوده وزنی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم به طور تصادفی در ۶گروه ۵ تایی تقسیم شدند: گروه اول (موش‌های غیر دیابتی)، گروه دوم (موش‌های دیابتی)، و به گروه‌های دیابتی سوم تا پنجم عصاره شنبلیله به ترتیب با دوزهای ۵۰۰،۲۵۰،۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و گروه ششم (متفورمین با دوز ۱۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)به مدت ۳ هفته خورانده شد. بیماری دیابت با یک بار تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۶۵mg/kg وزن بدن القا شد.در پایان دوره تیمار اثر متفورمین و شنبلیله برمیزان وزن بدن و اسیب‌های بافتی و پارامترهای بیوشیمیایی از قبیل گلوکز خون،تری گلیسرید، توتال‌کلسترول، HDL,LDL و میزان فعالیت انزیم‌های کبدی ALTوAST، میزان تولید MDA و فعالیت انزیم کاتالاز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. به علاوه بیان ژن انسولین با تکنیک RT-PCRبررسی گردید. انالیز اماری با استفاده از روش اماری ANOVA و تست TOKEY انجام گرفت. یافته‌ها: نتایج بدست امده کاهش معنی‌دار میزان گلوکز، تری گلیسرید، توتال کلسترول ،LDL، کاهش فعالیت ALT و AST و میزان تولید MDA ونیز افزایش معنی‌دار وزن، HDL و فعالیت انزیم کاتالاز را در رت‌های دیابتی شده با عصاره شنبلیله نسبت به گروه دیابتی را نشان داد. نتایج بافت شناسی نشان دادند که تیمار با عصاره موجب بهبودی قابل ملاحظه عوارض جانبی ناشی از دیابت قندی در بافت‌های بدن رت دیابتی می-شود. نتیجه گیری: یافته‌ها نشان می‌دهند که شنبلیله دارای اثرات انتی دیابتیک است و احتمالا می‌توان از ان به عنوان انتی اکسیدان و مکمل غذایی برای بیماران دیابتی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: دیابت، شنبلیله، استرپتوزوتوسین، متفورمین

فهرست مطالب

عنوان مطلب صفحه

فصل اول کلیات

۱-۱: مقدمه ۱
۱-۲: هدف و ضروریات طرح ۱
۱-۳: سابقه تحقیق ۲
۱-۴:مشخصات سیستماتیک شنبلیله ۳
۱-۴-۱:انتشار جغرافیایی ۳
۱-۴-۲: ترکیبات شیمیایی ۴
۱-۴-۳: خواص دارویی ۴
۱-۵: دیابت ۶
۱-۵-۱: کلیاتی درباره دیابت ۶
۱-۵-۲: تقسیم بندی دیابت ۶
۱-۵-۲-۱: دیابت نوع I ۶
۱-۵-۲-۲: دیابت نوع II ۷
۱-۵-۲-۳: دیابت بارداری ۷
۱-۵-۳: تشخیص دیابت ۹
۱-۶: گلوکز و ایجاد عوارض دیابت ۹
۱-۷: علائم دیابت ۱۰
۱-۷-۱: عوارض دیررس دیابت ۱۰
۱-۷-۱-۱: رتینوپاتی ۱۰
۱-۷-۱-۲: نفروپاتی ۱۰
۱-۷-۱-۳: نوروپاتی ۱۱
۱-۷-۱-۴: زخم پای دیابتی ۱۲
۱-۷-۱-۵: کتواسیدوز دیابتی ۱۲
۱-۸: درمان دیابت ۱۳
۱-۹: رادیکال‌های ازادو دیابت. ۱۴
۱-۹-۱: انواع رادیکال های ازاد ۱۵
۱-۹-۱-۱: سوپر اکسید O^{-}_{2} ۱۵
۱-۹-۱-۲: هیدروژن پراکسید ۱۵
۱-۹-۱-۳: نیتریک اکسید NO ۱۵
۱-۹-۱-۴: رادیکال هیدروکسیل ۱۵
۱-۱۰: انتی اکسیدان ها ۱۵
۱-۱۰-۱: انتی اکسیدان های انزیمی ۱۶
۱-۱۰-۱-۱: سوپراکسید دسموتاز SOD ۱۶

۱-۱۰-۱-۲: کاتالاز ۱۶
۱-۱۰-۱-۳: انزیم های گلوتاتیون پراکسیداز ۱۷
۱-۱۰-۱-۴: انزیم گلوتاتیون ردوکتاز ۱۷
۱-۱۱: استرس اکسیداتیو و دیابت ۱۷
۱-۱۲: پراکسیداسیون لیپیدی ۱۸
۱-۱۳: استرپتوزوتوسین ۱۸
۱-۱۴: متفورمین ۱۹
۱-۱۵: کلیاتی درباره پانکراس ۲۰
۱-۱۶: اصول ومبانی PCR ۲۲
۱-۱۶-۱: RT-PCR(Revers Transcription PCR) ۲۲
۱-۱۶-۲:RT-PCRکمی در زمان واقعی(Real Time Quantitative RT-PCR) ۲۳
۱-۱۶-۳:RT-PCRنیمه کمی (Semiquantitative RT-PCR) ۲۳

فصل دوم:مواد وروش ها

۲-۱:مواد ودستگاه ها. ۲۴
۲-۲: روش تهیه عصاره الکلی ۲۵
۲-۳: حیوانات ازمایشگاهی ۲۵
۲-۳-۱: گروه بندی و تیمار رت ها ۲۶
۲-۴: روش ایجاد دیابت در رت ها. ۲۶
۲-۵: اندازه گیری سطح گلوکز خون ۲۷
۲-۶:خونگیری از قلب ۲۷
۲-۷: نمونه برداری ۲۷
۲-۸: روش اندازه گیری عوامل سرم. ۲۷
۲-۹: روش اندازه گیری مالون دی الدئید در بافت کلیه ۲۸
۲-۱۰: روش اندازه گیری انزیم کاتالاز ۲۸
۲-۱۱: پاساژ بافتی ۲۸
۲-۱۱-۱:ابگیری ۲۸
۲-۱۱-۲: قالب گیری ۲۹
۲-۱۱-۳: برش گیری با میکروتوم ۲۹
۲-۱۱-۴: رنگ امیزی HE (هماتوکسیلین –ائوزین) ۲۹
۲-۱۱-۵: قرار دادن روی لام ها ۲۹
۲-۱۱-۶: طرز تهیه هماتوکسیلین ۳۰
۲-۱۱-۷: طرز تهیه ائوزین ۳۰
۲-۱۱-۸: طرز تهیه کربنات لیتیم ۳۰
۲-۱۱-۹: طرز تهیه اسید الکل ۳۰
۲-۱۲: اندازه گیری قطر توبول های سمینیفروس، ضخامت اپیتلیوم و بافت بینابینی ۳۰

۲-۱۳:بررسی های ژنتیکی ۳۱
۲-۱۳-۱: استخراج RNA ۳۱
۲-۱۳-۲: سنجش میزان RNA ۳۱
۲-۱۳-۳: مرحله سنتز cDNA ۳۱
۲-۱۳-۴: اماده سازی پرایمرهای مورد نیاز جهتPCR ۳۲
۲-۱۳-۵: واکنش زنجیره ای پلیمرازPCR ۳۳
۲-۱۳-۶: الکتروفورز ۳۴
۲-۱۴: انالیز اماری داده ها ۳۴

فصل سوم: نتایج

۳-۱: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی مقدار وزن بدن ۳۶
۳-۲: مقایسه اثرمتفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان گلوکز خون ۳۷
۳-۳: : مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان تری گلیسرید سرم ۳۸
۳-۴: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان کلسترول تام سرم ۳۹
۳-۵: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان -LDL ۴۰
۳-۶ :مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان HDL ۴۱
۳-۷: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی فعالیت میزان انزیمALT ۴۲
۳-۸: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی فعالیت میزان انزیمAST ۴۳
۳-۹:مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی دانه شنبلیه روی میزان فعالیت انزیم کاتالاز در بافت هموژنیزه شده کلیه ۴۴
۳-۱۰:مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله بر میزان MDA در بافت هموژنیزه شده کلیه ۴۵
۳-۱۱: مقایسه اثر متفومرین و عصاره هیدروالکلی شنبلیله بر بیان ژن انسولین و بتا اکتین ۴۶
۳-۱۲:مقایسه اثر متفومرین و عصاره هیدروالکلی شنبلیله بر قطر توبول سمینیفروس ۴۷
۳-۱۳:مقایسه اثر متفومرین و عصاره هیدروالکلی شنبلیله بر ضخامت بافت بینابینی بین توبول ها ۴۸
۳-۱۴: مقایسه اثر متفومرین و عصاره هیدروالکلی شنبلیله برضخامت اپیتلیوم توبول ها ۴۹
۳-۱۱: نتایج مربوط به یافته های مورفولوژیکی بیضه ۵۰
۴-۱۱: نتایج مربوط به یافته های مورفولوژیکی کبد ۵۱
۵-۱۱: نتایج مربوط به یافته های مورفولوژیکی کلیه ۵۲

فصل چهارم:

۴-۱: بحث مربوط به مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی تغییرات وزنی ۵۴
۴-۲: بحث مربوط به مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان گلوکز خون ۵۴
۴-۳: بحث مربوط به مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان تری گلیسرید سرم ۵۵
۴-۴: بحث مربوط به مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان کلسترول سرم ۵۶
۴-۵: بحث مربوط به مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزانHDLو LDL ۵۷
۴-۶: : بحث مربوط به مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزانAST وALT ۵۷

۴-۷: بحث مربوط به مقایسه اثر متفورمین وعصاره دانه شنبلیله برمیزان پراکسیداسیون لیپیدها و انزیم‌های انتی اکسیدانی ۵۸
۴-۸: بحث مربوط به کارهای مولکولی ۵۹
۴-۹: بحث مربوط به یافته های مورفولوژیکی کبد ۶۱
۴-۱۰: بحث مربوط به یافته های مورفولوژیکی کلیه ۶۱
۴-۱۱: بحث مربوط به یافته های مورفولوژیکی بیضه ۶۲
نتیجه گیری ۶۳
پیشنهادات ۶۴
منابع ۶۵

فهرست نمودارها واشکال

نمودار شماره ۳-۱: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی مقدار وزن بدن ۳۶
نمودار شماره ۳-۲: مقایسه اثرمتفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان گلوکز خون ۳۷
نمودار شماره۳ -۳: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان تری گلیسرید سرم ۳۸
نمودار شماره ۳-۴: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان کلسترول تام سرم... ۳۹
نمودار شماره۳-۵: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان -LDL ۴۰
نمودار شماره۳-۶ :مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی میزان HDL ۴۱
نمودار شماره ۳-۷: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی فعالیت میزان انزیم الانین امینو ترانسفراز (ALT) ۴۲
نمودار شماره ۳-۸: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله روی فعالیت میزان انزیم اسپارتات امینو ترانسفراز(AST) ۴۳
نمودار شماره ۳-۹ مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی دانه شنبلیه روی میزان فعالیت انزیم کاتالاز در بافت هموژنیزه شده کلیه ۴۴
نمودار شماره ۳-۱۰ مقایسه اثر متفومرین و عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله بر میزان مالون دی الدئید در بافت هموژنیزه شده کلیه ۴۵
نمودار شماره ۳-۱۱: مقایسه اثر متفورمین و عصاره هیدروالکلی شنبلیله بر بیان ژن انسولین و بتا اکتین ۴۶
نمودار شماره۳-۱۲: مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی شنبلیله بر قطر توبول سمینیفروس ۴۷
نمودار شماره ۳-۱۳: مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی شنبلیله بر ضخامت بافت بینابینی توبول ها. ۴۸
نمودار شماره ۳-۱۴: مقایسه اثر متفورمین وعصاره هیدروالکلی شنبلیله بر ضخامت اپیتلیوم توبول ها ۴۹

شکل ۱-۱: گیاه ودانه شنبلیله ۳
شکل ۳-۱:بیان ژن های بتااکتین و انسولین در پانکراس موش های دیابتی با استرپتوزوتوسین ۴۶
شکل ۳-۲: برش عرضی از بافت بیضه گروه کنترل.درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E ۵۰
شکل ۳-۳:برش عرضی از بافت بیضه گروه کنترلدیابتی.درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E ۵۰
شکل ۳-۴:برش عرضی از بافت بیضه گروه تحت تیمار با عصاره.درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E ۵۱

شکل۳-۵:برش عرضی از بافت بیضه گروه تحت تیمار با متفورمین.درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E...۵۱
شکل۳-۶: برش عرضی از بافت کبد گروه کنترل.درشت نمایی×۱۰۰، رنگ امیزی H&E.....۵۱
شکل ۳-۷:برش عرضی از بافت کبدگروه کنترل دیابتی.درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E.....۵۱
شکل ۳-۸:برش عرضی از بافت کبد گروه تحت تیمار با عصاره.درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E.....۵۲
شکل۳-۹:برش عرضی از بافت کبدگروه تحت تیمار با متفورمین درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E.....۵۲
شکل۳-۱۰:برش عرضی از بافت کلیه گروه کنترل درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E.....۵۲
شکل۳-۱۱:برش عرضی از بافت کلیه گروه کنترل دیابتی درشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E.....۵۳
شکل۳-۱۲:برش عرضی از بافت کلیه گروه تحت تیمار با عصارهدرشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E.....۵۳
شکل۳-۱۳:برش عرضی از بافت کلیه گروه تحت تیمار با متفورمیندرشت نمایی×۴۰۰، رنگ امیزی H&E...۵۳

جدول ۲-۱: سنتز cDNA.....۳۲
جدول ۲-۲: واکنش زنجیره ای پلیمراز.....۳۳

فصل اول: کلیات

۱–۱: مقدمه

دیابت حالتی است که در ان هموستاز متابولیسم کربوهیدرات‌ها و لیپیدها به صورت نامتناسب به وسیله انسولین تنظیم می‌شود که این امر ابتدا موجب افزایش قندخون ناشتا و پس از غذا می‌شود، اگر این هموستاز به حالت طبیعی باز نگردد و برای مدت طولانی ادامه یابد، موجب هیپرگلیسمی می‌شود که در طی زمان موجب سندرومی می‌شود که دیابت نامیده می‌شود (Zhang et al., 1996). در واقع دیابت یک بیماری مزمن و شایع و در عین حال مهمترین بیماری غدد درون ریز است که به لحاظ مشکلات درمانی و عوارض متعدد مشکل بزرگی برای سلامتی جهان محسوب می‌گردد. خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی، کلیوی، عروقی-محیطی، رتینوپاتی، نوروپاتی و قطع اندام‌های تحتانی را افزایش می‌دهد و سبب ایجاد درجات متفاوت ناتوانی در بیمار گشته و یا به مرگ منجر می‌شود. کنترل صحیح و دقیق بیماری می‌تواند بروز برخی عوارض را به تاخیر انداخته و یا از ظهور ان ممانعت به عمل اورد (Kleinet al., 2002).

دیابت یک سندرم اختلال متابولیسم کربوهیدرات، چربی و پروتئین است که توسط ترشح انسولین با کاهش حساسیت بافت‌ها به انسولین یا فقدان ان به وجود می‌اید (Lanza et al., 1999).

با توجه به عوارض متعدد دیابت در بیماران و توجه به اینکه راهکارهای درمانی فعلی برای درمان دیابت بخصوص نوع دوم محدودیت‌هایی نظیر افزایش ذخایر چربی، تحلیل رفتن بافت چربی در محل تزریق و بروز شوک هیپوگلیسمیک دارند، لزوم تحقیقات برای دستیابی به داروهای موثر و کم خطر برای کاهش قند و چربی خون در این بیماران کاملا محسوس است. امروزه در درمان دیابت از داروهای ضد دیابت زیادی استفاده می‌شود که کارایی نسبتاً خوبی دارند، اما عوارض جانبی این داروها در مصرف مداوم این‌گونه داروها بروز می-کند. به همین علت گرایش به سوی داروهای گیاهی که گفته می‌شود عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند روز به روزگسترش می‌یابد. تاکنون تحقیقات گسترده‌ای درزمینه داروهای گیاهی ضد دیابت صورت گرفته و گیاهان متعددی به عنوان پایین آورنده قندخون معرفی شده‌اند
(Yadva et al.,2002; Pepeto et al., 2002)

۱–۲: هدف و ضروریات طرح

گرایش عمومی جوامع به طب سنتی و استفاده از داروهای گیاهی در طی سال‌های اخیر به علت بروز اثرات زیان‌بار داروهای شیمیایی بر سلامتی انسان و نارسایی‌های متعدد طب نوین در درمان برخی بیماری‌ها رو به افزایش بوده است، همچنین نیاز مبرم به مواد موثره این گیاهان به عنوان مواد اولیه در صنایع داروسازی آرایشی و بهداشتی باعث شده است تا این گیاهان بیش از بیش از ارزش و اهمیت خاصی برخوردار باشند. گیاهان دارویی درطول تاریخ همواره قرابت خاصی با انسان داشته به طوریکه ایرانیان از دیرباز و حتی پیش از دیگران در زمینه شناخت گیاهان دارویی و کاربرد درمانی آنها از دانش پیشرفته‌ای برخوردار بوده‌اند.

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی با حداقل عارضه جانبی در درمان بیماری‌های متابولیک رایج از جمله دیابت و عوارض ناشی از ان ما را بران داشت تا در این پژوهش اثر تجویز عصاره هیدروالکلی دانه شنبلیله را به عنوان یک انتی‌اکسیدان برای تعیین خاصیت انتی دیابتیک در موش‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین بررسی نماییم.

۱-۳: سابقه تحقیق

در مطالعه‌ای که بر روی موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین انجام شد برگ شنبلیله به میزان نیم و یک گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت روزانه به تغذیه موش‌ها اضافه شد و به گروه شاهد ۶۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم داروی پایین آورنده قندخون گلیبنکلامید داده شد. پس از۴۵ روز قندخون، هموگلوبین گلیکوزیله، میزان انسولین پلاسما و آنزیم‌های کبدی (هگزوکیناز و گلوکز- ۶ - فسفاتاز) اندازه‌گیری شد. تغذیه با برگ شنبلیله (با مقدار ۱ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) باعث کاهش قندخون، افزایش انسولین پلاسما و افزایش فعالیت آنزیم هگزوکیناز (آنزیم کلیدی در افزایش متابولیسم گلوکز) شده بود (Anitha et al., 2003).

در یک مطالعه حیوانی که در مقایسه با انسولین درموش سوری توسط Vijaykumar صورت گرفته است، دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره خشک بذر شنبلیله توانسته است به اندازه انسولین ۱/۵ واحد بر کیلوگرم قندخون را در موش‌های دیابتی شده توسط آلوکسان پایین بیاورد، همچنین در این مطالعه که متغیرهای سطح سلولی نیز مطالعه شده است نشان داده شده است که عصاره شنبلیله با فعال‌سازی تولید انسولین در سلول‌های چربی وکبدی این کاهش قندخون و تحمل پذیری به گلوکز را انجام می‌دهد (Vijayakumar et al., 2008).

در مطالعه‌ی دیگر تریگونلین خالص‌سازی شده ازشنبلیله با دوز۵۰ گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی باعث کاهش قابل توجه قندخون در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان شد که این اثر تا ۲۴ ساعت پایدار بود (Mishkinsky et al., 1967).

در یک مطالعه دیگر تجویز مزمن خوراکی عصاره هیدروالکلی خشک بذر شنبلیله با دوز۱۰میلی‌گرم در موش های۳۰۰گرمی ظرف مدت دو هفته باعث افزایش مصرف غذا به میزان۲۰ درصد و تمرکز روی غذا خوردن بدون تغییر در میزان نوشیدن آب شده بود. همین رژیم تجویز شده از عصاره باعث افزایش انسولین پلاسما کاهش کلسترول کل و کلسترول VLDL-LDL در مقایسه با شاهد شده بود (Petit et al., 1993).

در مطالعه‌ای که بر روی موش انجام شد اضافه کردن عصاره بذر شنبلیله (معادل۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم از هیدروکسی ایزولوسین به ازای هرکیلو وزن بدن) به تغذیه انجام شده با گلوکز و انجام بیوپسی از بافت

عضلانی پس از تست ورزشی نشان داد که عصاره شنبلیله بیوسنتز گلیکوژن بافت عضلانی را به میزان ۶۳ درصد نسبت به گروه شاهد افزایش داده است (Stark et al., 1993).

شکل ۱-۱: گیاه ودانه شنبلیله

۱-۴: مشخصات سیستماتیک شنبلیله

شنبلیله یا شنبلید با نام علمی Trigonella foenum-graecum L، گیاهی نهاندانه، از دولپه‌ای‌های جداگلبرگ است که جزء راسته گل‌سرخ[1]، تیره نخود[2]، تیره فرعی پروانه‌داران[3] و جنس (*Trigonella* L) از گروه Trifolia است (Zargari, 1989).

شنبلیله گیاهی است علفی و یکساله که ارتفاع آن تا ۵۰ سانتی‌متر می‌رسد. ساقه به صورت منفرد غالبا خوابیده، با انشعابات کم، بدون کرک یا کرک‌های پراکنده است. برگ‌ها متناوب سه برگچه‌ای، بیضی شکل و دندانه‌دار بوده و برگچه‌ها از یک نقطه منشعب می‌شوند.گل‌ها به رنگ زرد روشن و گاهی بنفش مایل به سفید به قطر ۱/۸-۰/۸ سانتی‌متر بوده وگرده افشانی توسط حشرات انجام می‌گیرد. میوه‌ها به صورت نیام، خمیده و به طول ۱۱-۳ سانتی‌متر و محتوی ۲۰-۵ دانه زاویه‌دار به طول ۶-۴ میلی‌متر است. بذور تخم‌مرغی شکل سخت با بویی قوی و طعمی تلخ هستند که رنگ آنها از زرد حنایی تا قهوه‌ای تغییر می‌کند (Dini, 2006).

۱-۴-۱: انتشار جغرافیایی

منشأ این گیاه نواحی آفریقای شمالی و سواحل شرقی مدیترانه است. شنبلیله به طور گسترده‌ای در هند، چین، آفریقا، الجزیره، عربستان سعودی، پاکستان، مصر، ترکیه، اوکراین، اسپانیا و ایتالیا کاشته می‌شود.

1. Rosaceae
2. Legominosae
3. Papilonacea

بیش از ۱۰۰ نوع گونه وحشی و زراعی شنبلیله در دنیا شناسایی شده و بر اساس فلور ایرانیکا پراکنش بیش از گونه از این گیاه در بسیاری از نقاط ایران ازجمله آذربایجان، اصفهان، فارس، خراسان، سمنان، دامغان و نیز مناطق مرکزی گزارش شده است (Zargari, 1368).

۱-۴-۲: ترکیبات شیمیایی

فعالیت‌های بیولوژیکی و درمانی شنبلیله که به انواع مختلفی از ترکیبات ان از جمله استروئیدها، ترکیبات N، مواد پلی فنلی، ترکیبات فرار، آمینو اسیدها و غیره نسبت داده شده است.

دانه شنبلیله حاوی ۴۵-۶۰٪ کربوهیدرات، فیبرهای موسیلاژی عمدتا گالاکتومانان، ۲۰-۳۰ درصد پروتئین (لیزین و تریپتوفان)، ۵-۱۰ درصد روغن ثابت (لیپیدها)، آلکالوئیدهای پیریدین عمدتا شامل trigonelline(۰/۲-۰/۳۸ درصد) choline، (۰/۰۵ درصد) Gentanin و Carpaine می‌باشد.

فلاونوئیدها شامل apigenin, luteolin,orientin, quercetin, vitexin and isovitexin.

اسیدآمینه‌های آزاد از قبیل ۴- هیدروکسی ایزولوسین (۰.۰۹درصد)، هیستیدین و لیزین.

مهم‌ترین ساپوژنین‌های استروئیدی که غلظت ۰/۱تا ۲/ ۲ درصد دارند شامل دیوسژنین[1] و یاموژنین[2]می‌باشد.

ساپوژنین‌های دیگرعبارتند از:

Tigogenin، Gitogenin، Sarsapogenin، Yuccagenin، Smilagenin، همچنین دانه‌ها حاوی ساپوژنین استر–پپتیدی به نامFenugreekine می‌باشد.

کلسترول و Sitosterol، ویتامین‌های A، B_1، C و نیکوتین اسید و ۰/۰۱۵ درصد روغن‌های فرار (N-آلکان‌ها و ترپن) (Budavari, 1998, Mehrafarin et al., 2010).

۱-۴-۳: خواص دارویی

از دانه گیاه شنبلیله برای کم‌کردن میزان قند خون در بیماران دیابتی نوع دو به عبارتی غیر وابسته به انسولین استفاده می‌شود. هم‌چنین از ان برای کاهش میزان کلسترول و تری‌گلیسرید، درمان ورم معده، سردرد، نفخ شکم، امفی‌زم، ورم بیضه ، سوء هاضمه، زیادکننده شیر، سوختگی، کم اشتهایی، پوکی استخوان، کم کننده درد قاعدگی، الرژی، سرطان، ابسه سنگ صفرا، تب، کم خونی، عفونت ریوی و برای کاهش دید در بیماران دیابتی استفاده می‌گردد (Parvizpur et al., 2003).

در یک مطالعه اثرات مهاری عصاره هیدروالکلی بذر شنبلیله بر روی رشد سلول‌های سرطانی سلول‌های (EAC) بررسی و نشان داده است که تا۷۰ درصد رشد این سلول‌ها را مهار نموده است (Sur et al.,2001).

1.Diosgenin
2.yamogenin

T. foenum-graecum نشان داده شده است که اثرات تحریکی بر روی ماکروفاژها دارد. فعالیت فاگوسیتوز و کشتار میکروارگانیسم‌های مضر توسط ماکروفاژها خط اصلی دفاع بدن در برابر عفونت را تشکیل می‌دهد. مطالعات نشان داده است که T.foenum-graecum فعالیت ضدسرطان قابل ملاحظه‌ای دارد (VanFurt,1982). فلاونوئیدها دارای چندین اثر بیولوژیکی مختلف هستند و فعالیت القای اپپتوز انها در مطالعات قبلی شناسایی شده است (Chen et al., 2003).

rutin،Quercetin و دیگر فلاونوئیدها مواد غذایی نشان داده شده است که سرطان را در مدل‌های حیوانی مهار کرده است همه آنها آپوپتوز را در سلول‌های تومور القا می‌کنند (Katdare et al., 2002).

در یک مطالعه دیگر نشان داده شد که فلاونوئیدهای عصاره شنبلیله دارای فعالیت انتی‌اکسیدانی هستند (Moskaug et al., 2005; Ozcan et al., 2005). عصاره دانه مهار رادیکال هیدروکسیل و پراکسیدهیدروژن ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها در میتوکندری کبد موش‌های صحرایی را نشان داد (Kaviarasan et al., 2007).

در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که عصاره شنبلیله اثر تعدیلی بر سیستم ایمنی در موش mice دارد. نتایج نشان داد که قرار گرفتن در معرض دلتامترین باعث سرکوب سیستم ایمنی می‌شود و عصاره شنبلیله دارای اثرات تعدیلی بر این پارامترها می‌باشد (Hasibur, 2006).

در یک مطالعه‌ی دیگر اثر دانه شنبلیله نسبت به امپرازول بر زخم معده ناشی از اتانول بررسی شد. عصاره و بخش ژلی جدا شده از دانه نشان داد که اثر حفاظتی قابل توجهی بر زخم دارد. دانه شنبلیله همچنین مانع از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از اتانول احتمالا توسط افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدان مخاط معده در نتیجه کاهش صدمه به مخاط می‌شود (Tadigoppula et al., 2006).

در یک مطالعه‌ی دیگر نشان داده شده است که عصاره خشک اتانولی غنی ازساپونین بذر شنبلیله (نسبت عصاره به گیاه۱به۹) با MIC50 ۱/۲۵درصد به صورت ملایم جلوی رشد قارچ Candida sp و باکتری‌های E.coli، سودوموناس، استافیلوکوکوس، اورئوس و استرپتوکوکوی فکالیس را می‌گیرد (Abbasogluetal, 1995).

در یک بررسی دیگر نشان دادند که ساپونین‌های فوروستانول۱ شنبلیله دارای اثر ضدباکتریایی نیستند ولی وقتی توسط آنزیم β گلوکوزید به ساپونین نوع اسپیروستانول تبدیل شوند، محصول ایجاد شده اثر ضد قارچی وابسته به غلظت قوی علیه، T.harzianum،Rosellinia necatrixTrichoderma viride, نشان می‌دهد (Sauvaire et al., 1996).

۱–۵: دیابت

۱–۵–۱: کلیاتی درباره دیابت

بیماری دیابت ملیتوس بیماری شایعی است که در حال حاضر ۶/۶٪ در جهان و بیش از سه میلیون نفر در ایران به ان مبتلا هستند. این بیماری به دلایل مختلفی از جمله تخریب سلول‌های ترشح کننده‌ی انسولین در پانکراس ایجاد می‌شود. مهمترین علایم این بیماری هیپرگلیسمی، پلی اوری، پلی فاژی و گلوکز اوری است و از عوارض شایع ان، اسیدوز متابولیک است که خطرناک بوده و ممکن است منجر به شوک شود. در اثر این بیماری اعمال متابولیک دچار اختلال می‌شود و با وجود هیپرگلیسمی، بیشتر سلول‌های بدن قادر به استفاده از گلوکز برای تغذیه نیستند (Kassabet et al., 2001).

فعالیت اغلب سیستم‌های بدن تحت تاثیر این بیماری قرار می‌گیرد که از ان جمله می‌توان به تغییر در فعالیت قلبی عروقی، کلیه، سیستم عصبی و غیره اشاره کرد. میزان مرگ و میر ناشی از بیماری‌های قلبی عروقی در بیماران دیابتی بیشتر است. بروز مرگ و میر ناشی از بیماری قلبی عروقی در افراد دیابتی ۲۸/۷درصد است. در مقایسه با ۱۶/۳ درصد در گروه شاهد (افزایشی به میزان ۷۶ درصد) می‌باشد. تغییراتی که در متابولیسم لیپیدها به دنبال دیابت اتفاق می‌افتد به عنوان عامل خطرساز بیماری‌های کلیه، قلب و عروق مورد توجه قرار گرفته است (Järvisalo et al., 2002).

۱–۵–۲: تقسیم‌بندیدیابت

انجمن دیابت آمریکا[1](ADA)دیابت رابه ۳ گروه تقسیم‌بندی کرده است:

۱–۵–۲–۱: دیابت نوعI (IDDM)

در افرادی که دیابت نوع یک دارند سلول‌های بتا پانکراس که تولید انسولین را بر عهده دارند توسط یک واکنش اتوایمن تخریب شده‌اند. در نتیجه توقیف تولید و ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس در دیابت نوع اول وجود دارد.

در این بیماران جهت کنترل سطح گلوکز خون، تزریق انسولین ضروری است. مشخصه این تیپ دیابت بروز ناگهانی و حاد بیماری قبل از ۳۰ سالگی می‌باشد و تزریق انسولین ضروری است. ظاهرا ترکیبی از عوامل ژنتیک، ایموژنیک و احتمالا محیطی (مثل ویروس) در تخریب سلول‌های بتا دخالت دارند (Klein, 2002)

1. American Diabetes Association
2. Insulin dependent diabetes mellit

۱–۵–۲–۲: دیابت نوع II (NIDDM):

شایع‌ترین فرم دیابت است که این بیماری با اسامی دیابت بزرگسالی، دیابت مرتبط با چاقی و دیابت غیر-وابسته به انسولین (NIDDM)[1] نیز شناخته می‌شود. ۸۵ تا ۹۰ درصد مبتلایان به دیابت دچار این تیپ هستند. در این افراد مقاومت به انسولین (کاهش حساسیت بافت‌ها نسبت به انسولین) و تخریب انسولین ترشحی وجود دارد. در نتیجه بدن فرد انسولین تولید می‌کند اما به دلیل مقاومت گیرنده‌های سلولی انسولین وارد سلول نشده و عمل خود را نمی‌تواند انجام دهد.

ظاهرا عوامل ژنتیکی در بروز این تیپ دیابت نقش دارند. معمولا ورزش، کنترل رژیم غدایی و مصرف داروهای خوراکی ضد دیابت در درمان مبتلایان موثر می‌باشد (Arkinson, 2001).

۱–۵–۲–۳: دیابت بارداری:

عدم تحمل گلوکز با شدت متغیر که اولین بار در طی بارداری شروع و یا تشخیص داده شود، دیابت بارداری (Gestational Diabet Mellitus) گفته می‌شود و یا دیابت بارداری به شرایطی اطلاق می‌گردد که سطح گلوکز خون درطی بارداری بالا رفته و علائم دیابت در خانم بارداری که قبلاً دیابت برایش تشخیص داده نشده،دیده شود. اصطلاح دیابت بارداری به این دلیل استفاده می‌شود که حاملگی با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی در متابولیسم گلوکز موجب بروز دیابت بارداری می‌شود (Cunningham et al., 2005)

بارداری، به طورفیزیولوژیک باعث ایجاد مقاومت به انسولین می‌شود که پس از زایمان این اختلال از بین می-رود. در زنانی که عملکرد سلول‌های بتا در پانکراس کمتراز مقدار طبیعی است، ممکن است ترشح انسولین جهت جبران این مقاومت کافی نباشد و باعث ابتلا به دیابت بارداری شود (Kremer et al., 2004).

حدود ۹۰ درصد از موارد ابتلا به دیابت در دوران بارداری به دلیل دیابت بارداری می‌باشد. شیوع ان ۱-۱۴ درصد متغیر است که به طور متوسط در حدود ۳ تا ۸ درصد زنان باردار مبتلا می‌شوند (Dabelea et al., 2005).

مطالعات متعددی نشان داد که زنان با سابقه بارداری در معرض خطر ابتلا به دیابت به ویژه نوع ۲ می‌باشند (Hossein et al., 2005). تشخیص زودرس این اختلال متابولیک شایع جهت پیشگیری از عوارض مادری و عوارض قبل از تولد بسیار مهم است (Saydah et al., 2005). عوامل خطرزای بروز دیابت بارداری کاملا شناخته نشده است. اما ریسک فاکتورهای احتمالی دیابت بارداری می‌توان، سابقه دیابت نوع۲ در افراد فامیل درجه یک خانواده، سن بالا، چاقی، افزایش فشارخون، افزایش تعداد پلاکت خون و افزایش هموگلوبین را نام برد (Kale et al., 2005) .

1: Non-Insulin dependent diabetes mellitus

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که دیابت بارداری خطر ایجاد پرفشاری خون و دیس‌لیپیدمی و در نتیجه افزایش احتمال ابتلا به اترواسکلروز و بیماری قلبی-عروقی را در طولانی مدت افزایش می‌دهد.
این بیماری با مراقبت‌های ویژه پزشکی قابل درمان است. کاهش مصرف کربوهیدرات‌ها و محدودکردن دریافت قندهای خالص، افزایش تعداد وعده‌های غذا و کاهش حجم وعده‌ها از جمله عوامل بهبود بخش بشمار می‌رود (Lawrence et al., 2008).

اثرات سوء دیابت بارداری بر روی جنین شامل:

۱- افزایش خطر ایجاد ماکروزومی: که منجر به عوارضی مانند دیستوشی شانه و آسیب شبکه بازویی می‌شود و به استثنای مغز سایر ارگان‌های جنین دچار ماکروزومی می‌شوند، ماکروزومی این نوزادان با هیپرانسولینی نوزاد ناشی از هیپرگلیسمی مادر ارتباط تنگاتنگ دارد (Jocobson etal., 1989).

۲- هیپوگلیسمی نوزادی: افت شدید غلظت گلوکز پلاسما پس از زایمان از مشخصات نوزادان مادران دیابتی است. این رخداد به هیپرپلازی سلول‌های β پانکراس جنین در اثر هیپرگلیسمی مزمن مادر نسبت داده می‌شود. هیپر انسولینی به نوبه خود باعث تحریک بیش از حد رشد سوماتیک می‌شود، همچنین هیپرانسولینی نوزاد ممکن است در دقایق اولیه پس از تولد باعث بروز هیپوگلیسمی می‌شود. بروز این واقعه بسیار متغیر است و بستگی به آستانه تعیین شده برای تشخیص هیپوگلیسمی نوزادی دارد (Gunningham et al., 2001).

۳- هیپربیلیروبینمی: پاتوژنز هیپربیلیروبینمی در نوزادان مادران دیابتی روشن نیست ولی نارس بودن و پلی سپتمی و همولیز را دراین امر دخیل دانسته‌اند.

۴- هیپرتروفی قلبی: این نوزادان ممکن است دچار کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک باشند که ندرتاً به سمت نارسایی احتقانی قلب پیشرفت می‌کند. نوزادان مذکور مشخصاً ماکروزمیک بوده و هیپرانسولینی در پاتوژنز مقصر شناخته شده است.

۵- پلی‌سیتمی: اعتقاد بر این است که پلی سیتمی نتیجه هیپوکسی مزمن داخل رحمی بوده که منجر به افزایش اریتروپوتین و تولید گویچه‌های قرمز می‌گردد (Reece et al., 2003).

سایر انواع اختصاصی دیابت که در ارتباط با شرایط یا سندرم‌های بالینی خاص هستند .این دسته شامل گروه وسیعی از سندرم‌های دیابتی می‌شود که در ارتباط با اختلالات ژنتیکی یا بیماری‌ها یا داروهای خاص هستند؛ مواردی مانند بیماری‌های اگزوکرین پانکراس اندوکرینوپاتی‌ها، عفونت‌ها و...