

بررسی اثر عصاره آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه (*Bunium persicum*) بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداشده موش سوری نر

اکرم آهنگرپور^۱، علی اکبر عروجن^{۲*}، حمید حیدری^۳، ایرج احمدی^۴

تاریخ دریافت ۱۳۹۳/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۳/۰۶/۲۳

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: با توجه به استفاده از زیره سیاه در طب سنتی برای درمان دیابت، در این مطالعه اثر عصاره دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداشده موش سوری نر بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر موش‌های نر بالغ، نژاد NMARI (۲۵-۲۰ گرم) خریداری شد. جزایر لانگرهانس به روش هضم توسط کلاژناز جداسازی گردید. محیط‌های کشت جزایر جداسازی شده به ۱۸ گروه: گلوکز ۲/mM8 و ۱۶/۷، عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه (۰/۱۰/۰۵mg/ml و ۱) و گلیبوراید (۱۰ و ۱μM) تقسیم شد. سپس هر غلظت از عصاره‌ها و گلیبوراید به‌طور جداگانه بر جزایر اثر داده شدند. ترشح انسولین از جزایر در یک سیستم انکوباسیون ارزیابی و مقدار انسولین ترشح‌شده توسط روش ایمونورادیومتریک IRMA مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان ترشح انسولین در غلظت‌های ۰/۱۰۵mg/ml و ۰/۱ از عصاره دانه زیره سیاه، در محیط‌های کشت حاوی گلوکز ۲/۸mM و ۱۶/۷، در مقایسه با گروه‌های گلوکز ۲/۸mM و ۱۶/۷ به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت ۰/۱۰۵mg/ml عصاره آبی در محیط کشت حاوی گلوکز ۲/۸mM و ۱۶/۷ منجر به افزایش ترشح انسولین در مقایسه با غلظت‌های مختلف عصاره آبی‌الکلی گردید. همچنین داروی گلیبوراید ۱۰μM بیشترین اثر را در افزایش ترشح انسولین از جزایر جداسازی شده نسبت به گروه‌های گلوکز ۲/۸mM و ۱۶/۷ از خود نشان داد ($p < 0.001$).

بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج نشان داد، عصاره دانه زیره سیاه در غلظت‌های پایین قادر به افزایش ترشح انسولین بوده و این اثر همانند تأثیر داروی گلیبوراید ۱μM در محیط غلظت ۲/۸mM گلوکز و گلیبوراید ۱۰μM در محیط غلظت ۱۶/۷mM گلوکز هست. بنابراین چنین پیشنهاد می‌شود که یکی از مکانیسم‌های کاهنده قند خون زیره سیاه از طریق اثر بر جزایر لانگرهانس و تحریک ترشح انسولین هست.

کلیدواژه‌ها: دیابت، جزایر لانگرهانس، زیره سیاه، انسولین، گلیبوراید

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره هشتم، ص ۷۵۱-۷۴۲، آبان ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، تلفن: ۰۹۱۶۶۰۵۹۲۱۷

Email: aliakbar_orojan@yahoo.com

مقدمه

سراسر جهان رو به افزایش است. تنها در کشور آمریکا در حدود ۲۳/۶ میلیون نفر کودک و بزرگسال (۷/۸ درصد جمعیت) دچار این بیماری هستند (۲). در ایران نیز حدود ۲/۵۰۰/۰۰۰ نفر که ۶ درصد جمعیت بین ۷۹-۲۰ سال را تشکیل می‌دهند، مبتلا به بیماری دیابت می‌باشند و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۲۵ این عدد به حدود ۵/۱۱۴/۹۰۰ نفر برسد (۳).

دیابت ملیتوس یکی از مهم‌ترین اختلالات متابولیکی در جهان امروز بوده و اهمیت این بیماری بیشتر به دلیل شیوع روزافزون و عوارض طولانی‌مدت آن است. بارزترین ویژگی این بیماری افزایش گلوکز خون ناشی از اختلال ترشح یا عملکرد انسولین و یا هر دو آن‌ها است (۱). شیوع بیماری دیابت در

^۱ دانشیار فیزیولوژی، پژوهشکده سلامت، مرکز تحقیقات دیابت، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز، اهواز، ایران

^۲ دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران (نویسنده مسئول)

^۳ استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران

^۴ دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

کنترل کننده قند خون انسولین بوده که توسط محرک‌های مختلفی از جمله افزایش گلوکز خون، از جزایر لانگرهانس ترشح می‌شود علاوه بر این یکی از مکانیسم‌های پایین آورنده گلوکز خون، افزایش ترشح انسولین از این جزایر می‌باشد (۱۹). در بررسی های متعددی اثرات ضدهیپرگلیسمی زیره سیاه از نوع *Carum carvi* بر روی موش‌های صحرایی به اثبات رسیده است (۲۰). همچنین در مطالعه Eidi A و همکاران (۲۱) به روش *in vivo* مشخص گردید که عصاره اتانولی زیره سیاه *C. carvi* منجر به افزایش معنی‌داری بر میزان انسولین سرم موش‌های صحرایی دیابتی می‌گردد. بنابراین با توجه به اثر دانه زیره سیاه *B. persicum* بر کاهش قند خون (۱۷) به صورت *in vivo* و نبود مقاله ای در ارتباط با تأثیر گونه ایرانی این گیاه *B. persicum* بر میزان ترشح انسولین به صورت *in vitro* و همچنین برای درک بهتر از مکانیسم اثر این دانه، برای اولین بار در مطالعه حاضر اثر عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی دانه این گیاه بر ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جدا شده موش سوری نر و مقایسه این اثر با داروی ضددیابتی گلیبوراید به صورت *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه:

در مطالعه تجربی حاضر دانه گیاه زیره سیاه (به شماره هرباریوم UB-3521) موجود در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز) خریداری شد و به تایید متخصص فارماکوتوزی دانشکده فوق، جناب آقای دکتر محمد ابراهیم عازمی رسید. جهت تهیه عصاره آبی‌الکلی این دانه، پس از خشک و پودر نمودن دانه زیره سیاه بوسیله آسیاب برقی، مقدار ۵۰ گرم از پودر آن را در ۲۰۰ ml متانول ۸۰ درصد و آب (۷۰-۳۰) مخلوط کرده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، مخلوط را با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ و کیف بوختر صاف نموده و با دور ۳۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از جداسازی مایع روئی و قرار دادن آن در دمای اتاق حلال آن تبخیر و در نهایت به خمیری غلیظ تبدیل شد. راندمان عصاره‌گیری حاصل از عصاره آبی‌الکلی این گیاه ۲۲ درصد بود (۲۲). جهت تهیه عصاره آبی دانه زیره سیاه، ۵۰ گرم از پودر آسیاب شده را در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد. بعد از عبور مخلوط حاضر از صافی، به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. در نهایت محلول روئی را در دمای اتاق قرار داده و پس از تبخیر حلال آن، به صورت خمیری غلیظ درآمد. راندمان عصاره‌گیری عصاره آبی دانه زیره سیاه پس از خشک شدن

هیپرگلیسمی ناشی از دیابت، با عوارض متعددی از جمله هیپرانالژی، نوروپاتی محیطی، رتینوپاتی، بیماری‌های قلبی‌عروقی و بیماری‌های کلیوی همراه است (۵،۴). در این بیماران، ایجاد مقاومت به انسولین علت پاتوژنیک اولیه می‌باشد. در ابتدا افزایش ترشح انسولین، مقاومت به انسولین را جبران می‌کند اما در طول زمان، فعالیت سلول‌های ترشح کننده انسولین کاهش یافته و در نتیجه تحمل به گلوکز کاهش می‌یابد. در این زمان سلول‌های مترشح انسولین به محرک‌های دیگر مثل سولفونیل اوره‌ها بخوبی پاسخ نمی‌دهد. همچنین استفاده طولانی‌مدت از این داروها به دلیل ایجاد اثرات جانبی و همچنین ایجاد مقاومت دارویی و کاهش کارایی آن‌ها پس از چند سال، امکان‌پذیر نمی‌باشد (۶). از طرفی در حال حاضر، ساخت مصنوعی برخی از مواد فعال بیولوژیک، به دلیل داشتن ساختمان شیمیایی پیچیده یا ناشناخته، امکان‌پذیر نبوده و یکی از راه‌های استفاده آن‌ها بهره‌برداری طبیعی می‌باشد (۸،۷). در دو دهه اخیر محققین شروع به بازنگری داروهایی با منشأ طبیعی نموده‌اند. به طوریکه امروزه داروهای با منشأ گیاهی گسترش زیادی یافته و پرداختن به گیاهان دارویی قسمتی از برنامه‌های سازمان بهداشت جهانی در زمینه سیاست‌های دارویی است (۱۰،۹). گیاهان دارویی در طب سنتی برای کنترل و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله دیابت به کار برده می‌شوند. در منابع طب سنتی به گیاهان مختلفی برای درمان دیابت اشاره شده و بر آورد شده است که بیش از ۸۰ نوع گیاه برای درمان دیابت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲،۱۱) و اثر هیپوگلیسمی تعداد زیادی از این گیاهان در مدل‌های حیوانی و مطالعات بالینی بررسی و مورد تایید قرار گرفته است (۱۳). زیره سیاه *B. persicum* گیاهی دو ساله، به ارتفاع ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متر و دارای ساقه توخالی، شیاردار و منشعب است. برگ‌ها با تقسیم شانه ای و دارای زاویه بدون دمبرگ می‌باشد. گل‌های آن کوچک، سفید یا صورتی و مجتمع به صورت چتر مرکب است (۱۲). زیستگاه طبیعی این گیاه در ایران، استان های تهران، قزوین، کرمان، خراسان، بندرعباس، اصفهان، فارس، سمنان و یزد می‌باشد (۱۴). ترکیبات اصلی دانه زیره سیاه ترینین، کومین آلدئید، لیمونن، ساینن، کاروون، کاروئول، فلاونوئیدها، کومارین، دی هیدروکاروئول و ترپنن می‌باشند و از میان آن‌ها ترینین و کومین آلدئید بالاترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند (۱۵). در کتاب های طب سنتی ایرانی چندین اثر درمانی دانه زیره سیاه از جمله درمان اختلالات گوارشی و مجاری ادراری، ادراری آوری، ضد یبوست، ضد آسم و تنگی نفس به ثبت رسیده است (۱۶). اخیراً در تحقیقات آزمایشگاهی در گزارش‌های مختلف اثرات کاهندگی قندخون و ضددیابت این گیاه مورد بررسی و تایید قرار گرفته است (۱۸،۱۷). مهمترین هورمون

pH محلول در ۷/۴ حفظ گردید (۲۶). (کلیه ترکیبات در تهیه محلول بافر کربس بیکربنات از شرکت مرک آلمان تهیه گردید).

روش‌های آزمایشگاهی:

جداسازی جزایر لانگرهانس:

جداسازی جزایر لانگرهانس حیوانات مورد مطالعه با استفاده از تکنیک O'Dowd JF (۲۷) با تغییرات جزئی انجام پذیرفت که طی آن در ابتدا حیوان تحت یک بیهوشی با اتر قرار گرفت سپس پانکراس از بدن حیوان جدا گردید. پانکراس جدا شده ابتدا در یک پتری دیش محتوی ۵۰ ml محلول بافر کربس بیکربنات قرار گرفته و با استفاده از قیچی بسیار ظریف به قطعات ۱ mm × ۱ mm تقسیم شد. محتویات به لوله پلاستیکی فالكون منتقل گردید سپس به مدت ۵ دقیقه در سرعت ۱۰۰ g سانتریفیوژ انجام گرفت. بعد از سانتریفیوژ محلول رویی را که محتوی چربی بود با استفاده از سمپلر جدا نموده و سوسپانسیون انتهایی به لوله مخروطی به حجم ۱۵ ml انتقال یافت. جهت هضم پانکراس و جداسازی جزایر از بافت آگزوکترین، کلاژناژ تیپ ۷، خریداری شده از شرکت Gibco آمریکا، به محلول اضافه گردید. لوله مخروطی به منظور هضم بافت آگزوکترین پانکراس در داخل حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت و با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰-۸ دقیقه تکان داده شد. جهت متوقف کردن عمل هضم توسط کلاژناژ، ۵۰ ml محلول بافر سرد کربس بیکربنات اضافه گردید و به دنبال آن سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰ g در مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت. در نهایت پس از حذف محلول رویی عمل شستشوی سوسپانسیون انتهایی ۲ بار دیگر تکرار شد. سپس سوسپانسیون انتهایی به پتری دیش با زمینه سیاه منتقل گردید. زمینه سیاه پتری دیش این امکان را فراهم می‌سازد که جزایر سفید با استفاده از استریومیکروسکوپ به خوبی تمایز داده شوند. جزایر دست چین شده به پتری دیش محتوی محلول کربس سرد منتقل گردید.

بررسی ترشح انسولین:

در این مرحله جزایر در داخل پتری دیش‌های پلاستیکی کوچک (۷ جزیره در هر پتری دیش) قرار داده شد، بنابراین تعداد کل نمونه‌ها در هر بار آزمایش ۱۸ نمونه ۷ تایی از جزایر بود که این اعمال برای هر گروه، ۷ بار تکرار گردید. سپس به پتری دیش‌های فوق‌الذکر جهت بررسی مقدار ترشح انسولین در غلظت‌های پایه و تحریکی گلوکز به ترتیب محلول‌های بافر کربس بیکربنات را که محتوی ۲/۸ mM و ۱۶/۷ mM گلوکز بودند اضافه نموده و حجم پتری دیش‌ها همراه با ۱۰ و ۱۰۰ μM گلیبوراید و یا غلظت‌های مختلف عصاره (۰/۰۵ mg/ml، ۰/۱ و ۱) به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. جزایر برای مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در هنگام انکوباسیون، از گاز کربوژن

۲۴ درصد بدست آمد لازم به ذکر است که عصاره‌ها تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتیگراد یخچال نگهداری شدند (۲۳). جهت تهیه غلظت‌های مختلف عصاره آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه پودر حاصل از عصاره گیری در محلول بافر کربس بیکربنات مورد استفاده در این تحقیق حل گردید.

آماده‌سازی حیوانات:

حیوانات مورد استفاده در این تحقیق موش‌های سوری نر نژاد NMARI در محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۵ گرم تهیه شده از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه جندی شاپور اهواز خریداری و در دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتیگراد تحت چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و بر اساس قوانین اخلاقی و اصول مراقبت از حیوانات نگهداری شدند. آب مصرفی موش‌ها از آب آشامیدنی شهری تأمین و غذای آن‌ها از شرکت خوراک دام پارس تهیه گردید همچنین حیوانات دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند. در این بررسی جزایر لانگرهانس جداسازی شده موش‌ها، در محیط‌های کشت، طبق گروه‌بندی زیر به ۱۸ گروه تقسیم شدند و تحت تأثیر مواد و محلول‌های مختلف قرار گرفتند. در گروه ۱ و ۲ به ترتیب ۱ ml از بافر کربس بیکربنات حاوی غلظت پایه گلوکز (۲/۸ mM) و غلظت تحریکی گلوکز (۱۶/۷ mM) (شرکت مرک آلمان) (۲۴) استفاده شد. ۶ گروه تست این بررسی میزان ۱ ml از بافر کربس بیکربنات محتوی غلظت پایه گلوکز را به همراه غلظت‌های مختلف (۰/۰۵ mg/ml، ۰/۱ و ۱) از عصاره‌های آبی‌الکلی و آبی دانه زیره سیاه دریافت کردند و در ۶ گروه دیگر مقدار ۱ ml از بافر کربس بیکربنات محتوی غلظت تحریکی گلوکز همراه با غلظت‌های مشابه ذکر شده از عصاره استفاده گردید. همچنین در این پژوهش ۴ گروه نیز به عنوان گروه‌های شاهد (کنترل مثبت) در نظر گرفته شد که ۲ گروه آن به ترتیب دریافت‌کننده غلظت ۱۰ و ۱۰۰ μM گلیبوراید (۲۵) (داروی استاندارد در درمان دیابت) (شرکت سیگما) به همراه ۱ ml از بافر کربس بیکربنات حاوی غلظت پایه گلوکز و ۲ گروه دیگر دریافت‌کننده غلظت مشابه از داروی گلیبوراید به همراه ۱ ml از بافر کربس بیکربنات حاوی غلظت تحریکی گلوکز بودند.

تهیه محلول بافر کربس بیکربنات:

۱۱۵ mM کلرور سدیم، ۵ mM کلرور پتاسیم، ۱۰ mM بیکربنات سدیم، ۱/۱ mM کلرور منیزیم، ۱/۲ mM فسفات سدیم و ۱۵ mM هپس، ۲/۵۶ mM کلرور کلسیم:

جهت آماده‌سازی محلول بافر کربس بیکربنات ترکیبات فوق‌الذکر به آلبومین ۵ درصد و گلوکز ۲/۸ mM و ۱۶/۷ mM جهت ساخت محلول گلوکز با غلظت پایه و تحریکی اضافه نموده و در حضور ترکیب گاز کربوژن (۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی‌اکسید کربن)،

یافته‌ها

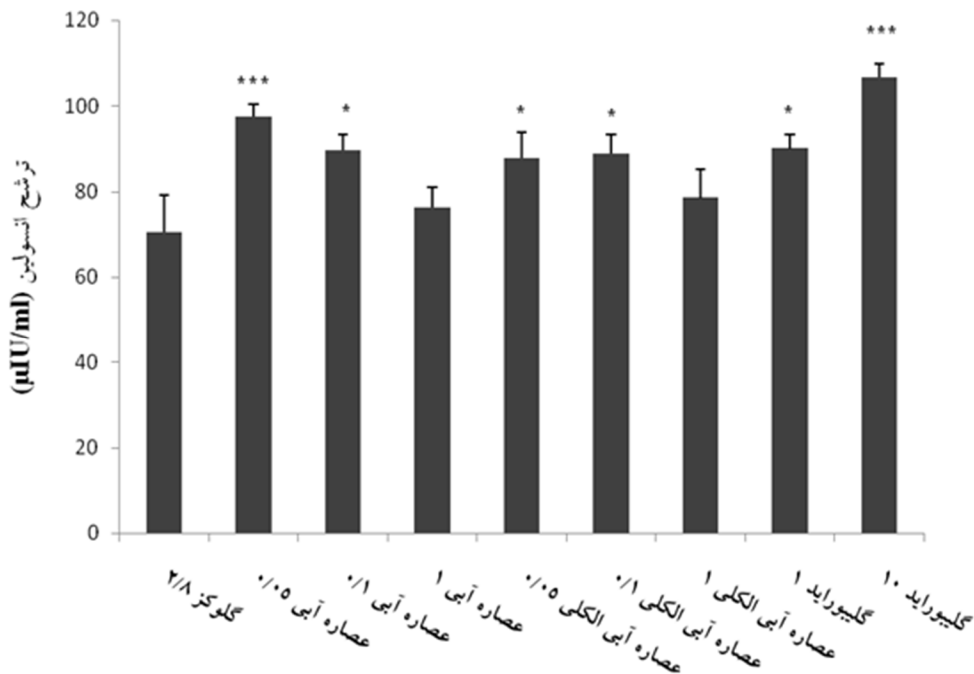
اثر عصاره آبی‌الکلی و آبی دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت پایه گلوکز: $۲/۸\text{mM}$:

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان ترشح انسولین در گروه‌های دریافت‌کننده غلظت ($۰/۱$ و $۰/۰۵\text{mg/ml}$) عصاره آبی‌الکلی دانه زیره سیاه به ترتیب $۸۷/۷۱ \pm ۶/۱۹$ ، $۸۸/۸۸ \pm ۴/۳۱$ ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه غلظت پایه گلوکز ($۲/۸\text{mM}$) $۷۰/۵۹ \pm ۸/۷$ افزایش یافت. این افزایش در گروه‌های دریافت‌کننده غلظت ($۰/۱$ و $۰/۰۵\text{mg/ml}$) عصاره آبی دانه زیره سیاه به ترتیب $۹۷/۵۱ \pm ۳/۲۲$ ($p < ۰/۰۰۱$)، $۸۹/۷۱ \pm ۳/۷۲$ ($p < ۰/۰۵$) نیز مشاهده گردید. همچنین در گروه‌های شاهد گلیبورااید ($۱\ \mu\text{M}$) $۹۰/۰۱ \pm ۳/۲۲$ ($p < ۰/۰۵$) و گلیبورااید ($۱۰\ \mu\text{M}$) $۱۰۶/۶۶ \pm ۳/۰۸$ ($p < ۰/۰۰۱$) مقدار ترشح انسولین توسط جزایر جداسازی شده به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه غلظت پایه گلوکز افزایش پیدا نمود (نمودار ۱).

(۹۵ درصد اکسیژن و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن) استفاده گردید. هر گروه به مدت یک دقیقه در شیکر گذاشته و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در نهایت گروه‌ها ۵ دقیقه با دور ۳۰۰rpm توسط سانتی‌یوئیوژ یخچال‌دار سانتی‌یوئیوژ شدند و $۹۰۰\ \mu\text{M}$ از محلول رویی جهت ارزیابی میزان ترشح انسولین، به لوله‌های ایندروف منتقل و تا زمان اندازه‌گیری این هورمون در دمای $۷۰-$ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. روش اندازه‌گیری هورمون انسولین:

جهت اندازه‌گیری هورمون انسولین از روش ایمونورادیومتریک (IRMA) و کیت DioSource INS-IRMA تهیه شده از شرکت Louvain-La-Neuve بلژیک با مقدار حساسیت $۱\ \mu\text{IU/ml}$ استفاده شد.

در بررسی و تحلیل آماری نتایج از نرم افزار آماری SPSS و روش‌های آماری مناسب استفاده شد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ محاسبه شده و به منظور بررسی وجود اختلاف و مقایسه گروه‌های مورد آزمایش، آنالیز واریانس یک طرفه و تست تکمیلی LSD مورد استفاده قرار گرفت همچنین مقادیر p کوچکتر از $۰/۰۵$ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

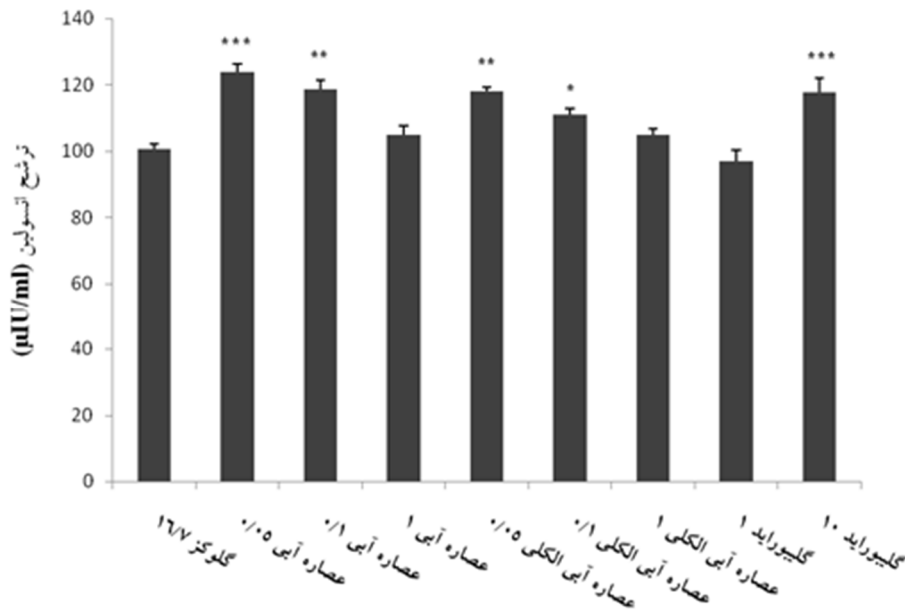


نمودار (۱): اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی، آبی‌الکلی دانه زیره سیاه (mg/ml) و گلیبورااید (μM) بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در حضور غلظت گلوکز $۲/۸\text{mM}$

($n=7$)، $p < ۰/۰۵$ ، *، $p < ۰/۰۰۱$ (در مقایسه با گروه غلظت گلوکز $۲/۸\text{mM}$)

اثر عصاره آبی‌الکلی و آبی دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز $16/7\text{mM}$:
ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در غلظت های $0/05\text{mg/ml}$ ($117/91 \pm 1/46$) ($p < 0/01$) و $0/1\text{mg/ml}$ ($111/03 \pm 1/76$) ($p < 0/05$) از عصاره آبی‌الکلی این دانه و غلظت‌های $0/05\text{mg/ml}$ ($123/77 \pm 2/56$) ($p < 0/001$) و $0/1\text{mg/ml}$ ($118/74 \pm 2/78$) ($p < 0/01$) از عصاره آبی دانه زیره سیاه و غلظت گلیبوراید ($10\mu\text{M}$) ($107/66 \pm 4/27$) ($p < 0/001$) در مقایسه با غلظت تحریکی گلوکز $16/7\text{mM}$ ($100/47 \pm 1/75$) افزایش یافت. اما استفاده از گلیبوراید ($1\mu\text{M}$) ($96/87 \pm 3/45$) تغییر معنی داری در ترشح انسولین از جزایر جداسازی شده در محیط حاوی گلوکز $16/7\text{mM}$ ایجاد نمود (نمودار ۲).

اثر عصاره آبی‌الکلی و آبی دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز $16/7\text{mM}$:
ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در غلظت های $0/05\text{mg/ml}$ ($117/91 \pm 1/46$) ($p < 0/01$) و $0/1\text{mg/ml}$ ($111/03 \pm 1/76$) ($p < 0/05$) از عصاره آبی‌الکلی این دانه و غلظت‌های $0/05\text{mg/ml}$ ($123/77 \pm 2/56$) ($p < 0/001$) و $0/1\text{mg/ml}$ ($118/74 \pm 2/78$) ($p < 0/01$) از عصاره آبی دانه زیره سیاه و غلظت گلیبوراید ($10\mu\text{M}$) ($107/66 \pm 4/27$) ($p < 0/001$) در مقایسه با غلظت تحریکی گلوکز $16/7\text{mM}$ ($100/47 \pm 1/75$) افزایش یافت. اما استفاده از گلیبوراید ($1\mu\text{M}$) ($96/87 \pm 3/45$) تغییر معنی داری در ترشح انسولین از جزایر جداسازی شده در محیط حاوی گلوکز $16/7\text{mM}$ ایجاد نمود (نمودار ۲).

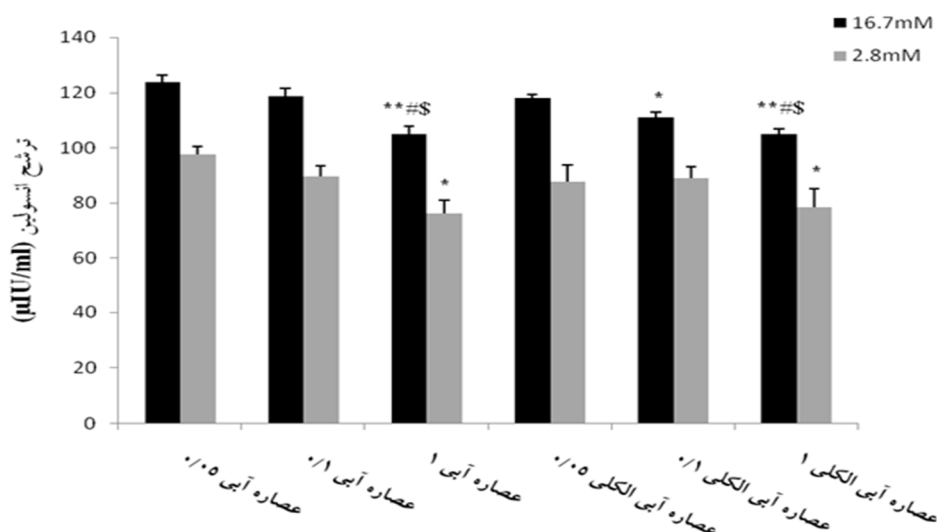


نمودار (۲): اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی، آبی‌الکلی دانه زیره سیاه (mg/ml) و گلیبوراید (μM) بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در حضور غلظت گلوکز $16/7\text{mM}$

***= $p < 0/001$ ، **= $p < 0/01$ ، *= $p < 0/05$ ، $n=7$) (درمقایسه با گروه غلظت گلوکز $16/7\text{mM}$)

مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت‌های پایه $2/8\text{mM}$ و تحریکی گلوکز $16/7\text{mM}$:
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقدار ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در غلظت $0/05\text{mg/ml}$ از عصاره آبی دانه زیره سیاه در محیط حاوی غلظت پایه گلوکز، در مقایسه با غلظت 1mg/ml از عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی این دانه افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($p < 0/05$). همچنین این غلظت از عصاره آبی دانه زیره سیاه در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز منجر به افزایش معنی‌دار ترشح انسولین در مقایسه با غلظت‌های 1mg/ml آبی و آبی‌الکلی شد (نمودار ۳).

مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت‌های پایه $2/8\text{mM}$ و تحریکی گلوکز $16/7\text{mM}$:
نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقدار ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در غلظت $0/05\text{mg/ml}$ از عصاره آبی دانه زیره سیاه در محیط حاوی غلظت پایه گلوکز، در مقایسه با غلظت 1mg/ml از عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی این دانه افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($p < 0/05$). همچنین این غلظت از عصاره آبی دانه زیره سیاه در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز منجر به افزایش معنی‌دار ترشح انسولین در مقایسه با غلظت‌های 1mg/ml آبی و آبی‌الکلی شد (نمودار ۳).



نمودار (۳): مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و آبی‌الکی زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در

حضور غلظت‌های پایه ۲/۸mM و تحریکی گلوکز ۱۶/۷mM

(n=7) ، *p<0/05 ، **p<0/01 در مقایسه با عصاره آبی ۰/۰۵mg/ml ؛ #p<0/05 در مقایسه با عصاره آبی ۰/۰۱mg/ml ؛ \$p<0/05

در مقایسه با عصاره آبی الکی ۰/۰۵mg/ml

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر بیانگر این مطلب بود که عصاره‌های آبی و آبی‌الکی دانه زیره سیاه با غلظت‌های ۰/۰۵mg/ml و ۰/۱ سبب افزایش معنی‌دار میزان ترشح انسولین از سلول‌های جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط کشت نسبت به محیط کشت جزایر لانگرهانس حاوی غلظت پایه و تحریکی گلوکز شده است. همچنین با افزایش بیشتر غلظت عصاره، ترشح انسولین نسبت به غلظت پایه و تحریکی گلوکز افزایش پیدا ننموده که می‌تواند احتمالاً ناشی از اثرات سمی این عصاره در غلظت‌های بالا و برهم زدن هموستاز جزایر لانگرهانس باشد. بنابراین برای بکار بردن عصاره دانه این گیاه در درمان دیابت بهتر است از غلظت‌های پایین‌تر آن استفاده شود. در تحقیق R Shafiee Nick و همکاران (۲۸) بر عصاره گیاه کلمپوره انجام دادند مشخص شد که غلظت‌های پایین (۰/۰۵ و ۰/۱ درصد) عصاره آبی الکی این گیاه منجر به افزایش ترشح انسولین از جزایر جداسازی شده می‌گردد اما غلظت بالای (۱ درصد) این عصاره نتوانست افزایشی در ترشح انسولین بوجود آورد همچنین در بررسی Pournour Mohamadi SH و همکاران (۱۹)، افزایش ترشح انسولین در غلظت‌های پایین (۰/۰۵mg/ml) عصاره برگ گیاه زیتون *Olea Europaea L.* به اثبات رسید اما این افزایش در غلظت‌های (۱ و ۱/۱mg/ml) مشاهده نگردید بنابراین این موضوع نشان می‌دهد که غلظت‌های بالای

عصاره‌های گیاه کلمپوره و برگ زیتون سمی بوده و هموستاز جزایر لانگرهانس را بهم ریخته است و با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت دارد. با توجه به این مطلب که یکی از ترکیبات اصلی تشکیل دهنده دانه زیره سیاه فلاونوئیدها می‌باشند و اثبات اثر فلاونوئیدها در افزایش ترشح انسولین به صورت *in vivo* و *in vitro* در مطالعه Ansarullah و همکاران (۲۹) بر گیاه *Oreocnide integrifolia*، می‌توان چنین پیشنهاد نمود که احتمالاً اثر افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس توسط این دانه ناشی از تأثیر فلاونوئیدهای موجود در آن بوده است. در بررسی Roman Ramos R و همکاران (۲۰) اثرات ضدهیپرگلیسمی زیره سیاه *C. carvi* بر روی موش‌های صحرایی اثبات شد و نشان داد که این گیاه باعث کاهش میزان گلوکز خون و کاهش سطح تحمل گلوکز می‌گردد. همچنین با توجه به حضور ترکیباتی چون کاروون، فلاونوئیدها و لیمونن در گیاه شوید (۳۰) و تأثیر این گیاه بر کاهش قند خون موش‌های صحرایی از طریق مکانیسم احتمالی افزایش ترشح انسولین بوسیله تحریک ترشحی سلول‌های بتای پانکراس و وجود این ترکیبات در دانه زیره سیاه چنین احتمال می‌رود که افزایش ترشح انسولین ناشی از عصاره این دانه از طریق تأثیر این ترکیبات بر جزایر لانگرهانس صورت گرفته که نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد (۳۱). در مطالعه‌های Patil SB و همکاران بر زیره سبز انجام دادند مشخص

گلوکز گردید علاوه بر این غلظت $1\mu\text{M}$ از این دارو نتوانست تغییر معنی‌داری در ترشح انسولین در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز ایجاد نماید که با نتایج حاصل از بررسی حاضر مطابقت دارد (۲۵). در مقایسه نتایج اثر عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی (0.5mg/ml و 0.1) با گلیبورايد $1\mu\text{M}$ مشخص گردید که این غلظت از عصاره‌ها اثری مشابه با داروی گلیبورايد $1\mu\text{M}$ بر ترشح انسولین در غلظت پایه گلوکز داشته و می‌توانند همانند این غلظت از دارو منجر به ترشح انسولین گردند. اما غلظت‌های مشابه از عصاره در محیط غلظت تحریکی گلوکز می‌تواند تاثیری برابر با گلیبورايد $10\mu\text{M}$ اعمال نموده و ترشح انسولین را به مقدار زیادی افزایش دهد.

درمجموع نتایج به دست آمده بیان‌کننده این مطلب است که غلظت‌های پایین عصاره آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه قادر به افزایش ترشح انسولین در محیط کشت جزایر لانگرهانس بوده و این اثر همانند تأثیر داروی گلیبورايد $1\mu\text{M}$ در غلظت پایه گلوکز و گلیبورايد $10\mu\text{M}$ در غلظت تحریکی گلوکز می‌باشد. در این میان بیشترین پاسخ افزایشی بر ترشح انسولین در غلظت 0.5mg/ml از عصاره آبی در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز مشاهده گردید. بنابراین می‌توان چنین پیشنهاد نمود که یکی از مکانیسم‌های کاهنده قندخون زیره سیاه از طریق اثر بر جزایر لانگرهانس پانکراس و تحریک ترشح انسولین از آن‌ها می‌باشد لذا تعیین دوز دقیق و ماده اثرگذار این گیاه مستلزم انجام تحقیقات بیشتر است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی دانشجویی به شماره ۹۱۵۶۶ می‌باشد و بدین وسیله از معاونت پژوهشی و کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که هزینه‌های اجرای این طرح تحقیقاتی را پرداخت نمودند قدردانی می‌شود.

References:

1. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26 Suppl 1:S5–20.
2. Hazavehei MM, Khani Jyhouni A, Hasanzade A, and Rashidi M. The effect of educational program

گردید که ترکیب کومین آلدئید موجود در این گیاه منجر به افزایش ترشح انسولین از سلول‌های بتای پانکراس می‌گردد. بنابراین با توجه به حضور مقادیر بالای این ترکیب در دانه زیره سیاه می‌توان چنین پیشنهاد نمود که اثر افزایشی ترشح انسولین این دانه در پژوهش حاضر نیز همانند زیره سبز به دلیل ترکیب کومین آلدئید موجود در آن صورت گرفته است (۳۲). مقایسه نتایج غلظت‌های مختلف عصاره آبی و آبی‌الکلی دانه زیره سیاه نشان داد که ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در غلظت‌های پایین عصاره آبی نسبت به عصاره آبی‌الکلی بیشتر می‌باشد، به‌گونه‌ای که غلظت 0.5mg/ml عصاره آبی دانه بیشترین افزایش در ترشح انسولین را در مقایسه با سایر عصاره‌ها از خود نشان داد. همچنین با توجه به تأثیر ترکیبات موثر دانه زیره سیاه در ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس مانند کومین آلدئید می‌توان چنین پیشنهاد نمود که ممکن است حضور این ترکیبات در عصاره آبی بیشتر بوده و در نهایت منجر به افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس شده است که نیازمند بررسی‌های بیشتری می‌باشد. گلیبورايد از داروهای ضد دیابتی، جز دسته داروهای ترشح کننده انسولین می‌باشد و در کلاس شیمیایی سولفونیل اوره قرار می‌گیرد. مکانیسم اثر این دارو به این طریق است که رهاسازی انسولین اندوژن را بوسیله پیشبرد و بسته شدن کانال‌های پتاسیم در غشا سلول‌های بتای پانکراس تحریک می‌کند. بسته شدن کانال، سلول را دیپولاریزه و رهاسازی انسولین را به راه می‌اندازد (۳۳) در این بررسی از این دارو جهت ایجاد ترشح انسولین از جزایر جداسازی شده در گروه‌های کنترل مثبت در غلظت‌های (10 و $1\mu\text{M}$) استفاده شد و در نهایت مشخص گردید که غلظت $10\mu\text{M}$ این دارو سبب افزایش ترشح انسولین در مقایسه با گروه‌های غلظت پایه و تحریکی گلوکز و غلظت $1\mu\text{M}$ آن تنها در مقایسه با غلظت پایه گلوکز، افزایش معنی‌داری را از خود نشان داد. در مطالعه‌ای که Khayatian M و همکاران انجام دادند غلظت‌های 10 و $1\mu\text{M}$ داروی گلیبورايد منجر به افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت پایه

- based on BASNEF model on diabetic (Type II) eyes care in Kazemi's clinic, (Shiraz). *Iran J Endocrinol Metab* 2008; 10(2): 145-54.
3. Hasani-Ranjbar S, Larjani B, Abdollahi M. A systematic review of Iranian medicinal plants useful in diabetes mellitus. *Arch Med Sci* 2008; 4, 3: 285–92.

4. Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic poly neuropathy: epidemiology, pain description and quality of life. *Diabetes Res Prac* 2000; 47: 123-8.
5. Dobretsov M, Hastings SL, Romanovsky D, Stimers JR, Zahng JM. Mechanical hyperglycemia in rats models of systemic and local hyperglycemia. *Brain Res* 2003; 960: 174-83.
6. Katzung BG. *Basic and Clinhcal Pharmacology*, 8th ed. New York, Lang Medical Books/McGraw-Hill, 2001; 725.
7. Reyes-García V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *J Ethnobiol Ethnomed* 2010; 17: 6-32.
8. Kim HJ, Jee EH, Ahn KS, Choi HS, Jang YP. Identification of marker compounds in herbal drugs on TLC with DART-MS. *Arch Pharm Res* 2010; 33(9): 1355-9.
9. Weiss RF, Finetelmann V. *Herbal medicine*. Thieme Stuttgart; 2000.P. 264.
10. Moussally K, Oraichi D, Bérard A. Herbal products use during pregnancy: prevalence and predictors. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2009; 18(6): 454-61.
11. Mozaffarian V. *A dictionary of Iranin plant, Names. Latin, English, Persian*. 1th ed. Tehran: Farhang Moasser Publications; 1995.P. 44. (Persian)
12. Zargari A. *Medicinal Plants*. 5th ed. Tehran: Tehran University Publications; 1993.P. 438-440. (Persian)
13. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care* 1989; 12(8): 553-64.
14. Haghrirossadat F, Bernard F, Kalantar M, Sheikhha M, Hokmollahi F, Azimzadeh M, et al. *Bunium Persicum* (Black Caraway) of Yazd province: Chemical assessment and Evaluation of its Antioxidant Effects . *JSSU* 2010; 18(3) :284-91. (Persian)
15. Moghtader M, Mansori A, Salari H, Farahmand A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Bunium persicum* Boiss. Seed. *Iran J Med Aromatic Plants* 2009; 25(1): 20-8. (Persian)
16. Boskabady MH, Moghaddas A. Antihistaminic Effect of *Bunium persicum* on Guinea Pig Tracheal Chains. *Iran Biomed J* 2004; 8(3): 149-55.
17. Giancarlo S, Rosa LM, Nadjafi F, Francesco M. Hypoglycaemic activity of two spices extracts: *Rhus coriaria* L. and *Bunium persicum* Boiss. *Nat Prod Res* 2006; 20(9): 882-6.
18. Ziyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol* 1997; 58: 45-54.
19. Pournour Mohamadi SH, Sharififar Fariba, Talebian E, Khayatian M, Rezazadeh SH.A, Moslehi AH. Effect of olive leave (*Olea Europaea* L.) on glucose-stimulated insulin secretion from isolated pancreatic islets of rat. *J Med Plants Dec* 2008; 7(28):38-46. (Persian)
20. Roman-Romos R, Flores-Saenz JL, Alarcon-Aguilar FJ. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *J Ethnopharmacol* 1995; 48: 25-32.
21. Eidi A, Eidi M, Haeri Rohani A, Basati F. Hypoglycemic Effect of Ethanolic Extract of *Carum carvi* L. Seeds in Normal and Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J Med Plants* 2010; 9(35): 106-13.
22. Naseri MKG, Arabian M, Badavi M, Ahangarpour A. Vasorelaxant and hypotensive effects of *Allium cepa* peel hydroalcoholic extract in rat. *Pak J Biol Sci* 2008;11(12):1569–75.
23. Ahangarpour A, Orooan AA. The effects of *Cassia italica* leaves aqueous extract on non-

- pregnant uterus contraction in rats. *Iran J Reprod Med* 2010; 8(4): 179-84.
24. Lu B, Wu H, Gu P, Du H, Shao J, Wang J, et al. Improved glucose-stimulated insulin secretion by intra-islet inhibition of protein-tyrosine phosphatase 1B expression in rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol Invest* 2012; 35(1): 63-70.
 25. Khayatan M, Larijani M, Farzami B, Boushehri H, Pournourmohammadi SH. Effects of glibenclamide on insulin secretion and glucokinase activity in normal and diabetic rat pancreatic islets. *Iran J Diabetes Lipid Disord* 2006; 6(1): 17-26. (Persian)
 26. Amaral AG, Rafacho A, Machado de Oliveira CA. Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. *Pancreas* 2010; 39(6): 847-55.
 27. O'Dowd JF. The isolation and purification of rodent pancreatic islets of Langerhans. *Methods Mol Biol* 2009; 560: 37-42.
 28. Shafiee-Nick R, Parizadeh S, Zokaei N, Ghorbani A. Effect of hydro-alcoholic extract of *Vaccinium arctostaphylos* on insulin release from rat-isolated langerhans islets. *Koomesh* 2011; 12(4): 447-51. (Persian)
 29. I. Ansarullah null, Bharucha B, Dwivedi M, Laddha NC, Begum R, Hardikar AA, et al. Antioxidant rich flavonoids from *Oreocnide integrifolia* enhance glucose uptake and insulin secretion and protects pancreatic β -cells from streptozotocin insult. *BMC Complement Altern Med* 2011;11:126.
 30. Jana S, Shekhawat GS. *Anethum graveolens*: An Indian traditional medicinal herb and spice. *Pharmacogn Rev* 2010; 4(8): 179-84.
 31. Ahmadi Mahmoudabadi N. The effects of hydroalcoholic extracts of Dill (*Anethum Graveolens L.*) and Artichoke (*Cynara Scolymus L.*) against type 1 diabetes mellitus. *Iran J Med Aromatic Plants* 2008; 24(3(41)): 333-41. (Persian)
 32. Patil SB, Takalikar SS, Joglekar MM, Haldavnekar VS, Arvindekar AU. Insulinotropic and β -cell protective action of cuminaldehyde, cuminol and an inhibitor isolated from *Cuminum cyminum* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr* 2013; 110(8):1434-43.
 33. Geng X, Li L, Bottino R, Balamurugan AN, Bertera S, Densmore E, et al. Antidiabetic sulfonylurea stimulates insulin secretion independently of plasma membrane KATP channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293(1): 293-301.

EFFECTS OF AQUEOUS AND HYDRO-ALCOHOLIC EXTRACTS OF *BUNIAM PERSICUM* SEED ON INSULIN SECRETION FROM MALE MOUSE-ISOLATED LANGERHANS ISLETS

Akram Ahangarpour¹, Ali Akbar Oroojan^{*2}, Hamid Heydari³, Iraj Ahmadi⁴

Received: 3 Jul, 2014; Accepted: 14 Sep, 2014

Abstract

Background & Aims: As *B. persicum* is used in treatment of diabetes, we aimed to study the effect of *B. persicum* seeds extract on level of insulin secretion from isolated islets of langerhans in male mouse.

Materials & Methods: In this experimental study, adult male mice (NMARI) weighting 20-25g were purchased. Islets of langerhans were isolated by collagenase digestion method and were divided into 18 groups: (glucose 2.8mM and 16.7mM), aqueous and hydro-alcoholic extracts of *B. persicum* seeds (0.05, 0.1, 1mg/ml) and glyburide (1, 10 μ M). Each concentration of extracts and glyburide applied separately on isolated islets. Insulin secretion from isolated islets was evaluated by a static incubation system, and insulin secretion amount was measured by IRMA method.

Results: Amount of insulin secretion in 0.05, 0.1mg/ml concentrations of *B. persicum* seed extracts in mediums containing glucose 2.8 mM and 16.7 mM increased significantly in comparison with glucose 2.8 mM and 16.7 mM groups. 0.05mg/ml of aqueous extract in mediums containing glucose 2.8 mM and 16.7 mM increased insulin secretion when compared to various concentrations of hydro-alcoholic extracts. also among all groups, glyburide 10 μ M showed most effective in increasing insulin secretion from isolated islets in comparison with glucose 2.8mM and 16.7mM groups ($p < 0.001$).

Conclusion: Overall, the results showed, seed's extract of *B. persicum* in low concentrations was able to increase insulin secretion and this effect is similar to the effect of glyburide 1 μ M on the secretion of this hormone in glucose 2.8mM medium as well as glyburide 10 μ M in glucose 16.7mM medium. So it's suggested that one of the *B. persicum* ablative blood sugar mechanisms is via the effect on langerhans islets and stimulation of insulin secretion.

Keywords: Diabetes, langerhans islets, *B. persicum*, insulin, glyburide.

Address: Ahvaz, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Physiology, Tel: 09166059217

Email: aliakbar_orojan@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2014; 25(8): 751 ISSN: 1027-3727

¹ Associated professor, Health research institute, Diabetes Research Center, Department of Physiology, Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Co-respond author, PhD student in Physiology, School of medicine, Department of Physiology and Member of Student Research Committee of Ahvaz Jundishapur University of Medical Science, Ahvaz, Iran

³ Assistant Professor of Physiology, Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Qom, Qom, Iran

⁴ PhD student in Physiology, Physiology Research Center, School of medicine, Department of Physiology, Jundishapur University of Medical Science, Ahvaz, Iran