Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

مقاله پژوهشی

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. جزایرلانگرهانس 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 (۰/۱،۰/۰۵mg/ml و ۱) و گلیبوراید (۱μM و ۱۰) 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 ایمونورادیومتریکIRMA مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان ترشح انسولین در غلظت‌های ۰/۰۵mg/ml و ۰/۱ از عصاره دانه زیره سیاه، در محیط‌های کشت حاوی گلوکز۲/۸mMو۱۶/۷، در مقایسه با گروه‌های گلوکز ۲/۸mMو۱۶/۷ به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت ۰/۰۵mg/ml عصاره آبی در محیط کشت حاوی گلوکز۲/۸mMو۱۶/۷ منجر به افزایش ترشح انسولین در مقایسه با غلظت‌های مختلف عصاره آبی‌الکلی گردید. همچنین داروی گلیبوراید۱۰μM بیشترین اثر را در افزایش ترشح انسولین از جزایر جداسازی شده نسبت به گروه‌های گلوکز۲/۸mMو۱۶/۷از خود نشان داد ($p<۰/۰۰۱$).

بحث و نتیجه‌گیری: درمجموع نتایج نشان داد، عصاره دانه زیره سیاه در غلظت‌های پایین قادر به افزایش ترشح انسولین بوده و این اثر همانند تأثیر داروی گلیبوراید۱μM 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، جزایرلانگرهانس، 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_oroojan@yahoo.com

مقدمه

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 سراسر جهان رو به افزایش است. تنها در کشور امریکا در حدود ۲۳/۶ میلیون نفر کودک و بزرگ‌سال (۷/۸درصد 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 سال۲۰۲۵ این عدد به حدود ۵/۱۱۴/۹۰۰ نفر برسد (۳).

[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 جندی شاپور اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور 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 جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

هیپرگلیسمی ناشی از دیابت، با عوارض متعددی ازجمله هیپرآنالژزی، 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 درنتیجه تحمل به گلوکز کاهش می‌یابد. در این زمان سلول‌های مترشحه 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 زمینهٔ 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 هیپوگلایسمی 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 ۳۰تا ۶۰ سانتی‌متر و دارای ساقه توخالی، شیاردار و منشعب است. برگ‌ها با تقسیم شانه ای و دارای زاویه بدون دمبرگ می باشد. 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 می باشد(۱۴). ترکیبات اصلی دانه زیره سیاه ترپینن، کومین آلدئید، لیمونن، سابینن، کاروون، کاروئول، فلاونوئیدها، کومارین، دی هیدروکاروئول و ترپنن می‌باشند و از میان آن‌ها ترپینن 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 کنترل کننده قند خون انسولین بوده که توسط محرک‌های مختلفی ازجمله 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 فارماکوگنوزی 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 ۲۰۰ml 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 قیف بوخنر صاف نموده و با دور ۳۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از جداسازی مایع رویی 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 رویی 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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

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 ازآب 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 ۱و۲ به ترتیب ۱ml از بافر کربس بیکربنات حاوی غلظت پایه گلوکز(۲/۸mM) و غلظت تحریکی گلوکز(۱۶/۷mM) (شرکت مرک آلمان) (۲۴) استفاده شد. ۶ گروه تست این بررسی میزان ۱ml 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 ۱ml از بافر کربس بیکربنات محتوی غلظت تحریکی گلوکز همراه با غلظت های مشابه ذکر شده از عصاره استفاده گردید. همچنین در این پژوهش ۴ گروه نیز به عنوان گروه‌های شاهد(کنترل مثبت) درنظرگرفته شد که ۲ گروه آن به ترتیب دریافت‌کننده غلظت ۱μM و۱۰ گلیبوراید (۲۵) (داروی استاندارد در درمان دیابت) (شرکت سیگما) به همراه ۱ml از بافر کربس بیکربنات حاوی غلظت پایه گلوکز و ۲ گروه دیگر دریافت کننده غلظت مشابه از داروی گلیبوراید به همراه ۱ml از بافر کربس بیکربنات حاوی غلظت تحریکی گلوکز بودند.

تهیه محلول بافر کربس بیکربنات:

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

جهت آماده‌سازی محلول بافر کربس بیکربنات ترکیبات فوق را به آلبومین ۵ درصد و گلوکز ۲/۸mM و ۱۶/۷mM جهت ساخت محلول گلوکز باغلظت پایه و تحریکی اضافه نموده و در حضور ترکیب گاز کربوژن (۹۵درصد اکسیژن و ۵درصد دی‌اکسیدکربن)، 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 ازتکنیک O'Dowd JF (۲۷) با تغییرات جزئی انجام پذیرفت که طی آن در ابتدا حیوان تحت یک بیهوشی با اتر قرارگرفت سپس پانکراس ازبدن حیوان جدا گردید. پانکراس جداشده ابتدا در یک پتری دیش محتوی ۵۰ml محلول بافر کربس بیکربنات قرار گرفته و با استفاده از قیچی بسیار ظریف به قطعات ۱mm×۱mm تقسیم شد. محتویات به لوله پلاستیکی فالکون 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 ۱۵ml انتقال یافت. جهت هضم پانکراس و جداسازی جزایر از بافت اگزوکرین، کلاژناز تیپ V، خریداری شده از شرکت Gibco آمریکا، به محلول اضافه گردید. لوله مخروطی به منظور هضم بافت اگزوکرین 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 کلاژناز، ۵۰ml محلول بافر سرد کربس بیکربنات اضافه گردید و به دنبال آن سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰g در مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت. درنهایت پس از حذف محلول رویی عمل شستشوی سوسپانسیون انتهایی ۲ بار دیگر تکرار شد. سسپس سوسپانسیون انتهایی به پتری دیش با زمینه سیاه منتقل گردید. زمینه سیاه پتری دیش این امکان رافراهم 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 فوق الذکر جهت بررسی مقدار ترشح انسولین در غلظت های پایه و تحریکی گلوکز به ترتیب محلول های بافر کربس بیکربنات را که محتوی ۲/۸mM و ۱۶/۷mMگلوکز بودند اضافه نموده و حجم پتری دیش‌ها همراه با ۱μM و۱۰ گلیبوراید و یا غلظت‌های مختلف عصاره (۰/۰۵mg/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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

(۹۵درصد اکسیژن و ۵درصد دی‌اکسیدکربن) استفاده گردید. هر گروه به مدت یک دقیقه در شیکر گذاشته و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. درنهایت گروه‌ها ۵ دقیقه با دور ۳۰۰rpm توسط سانتریوفیوژ یخچال‌دار سانتریوفیوژ شدند و ۹۰۰μM از محلول رویی جهت ارزیابی میزان ترشح انسولین، به لوله‌های اپندروف منتقل و تا زمان اندازه‌گیری این هورمون در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

روش اندازه‌گیری هورمون انسولین:

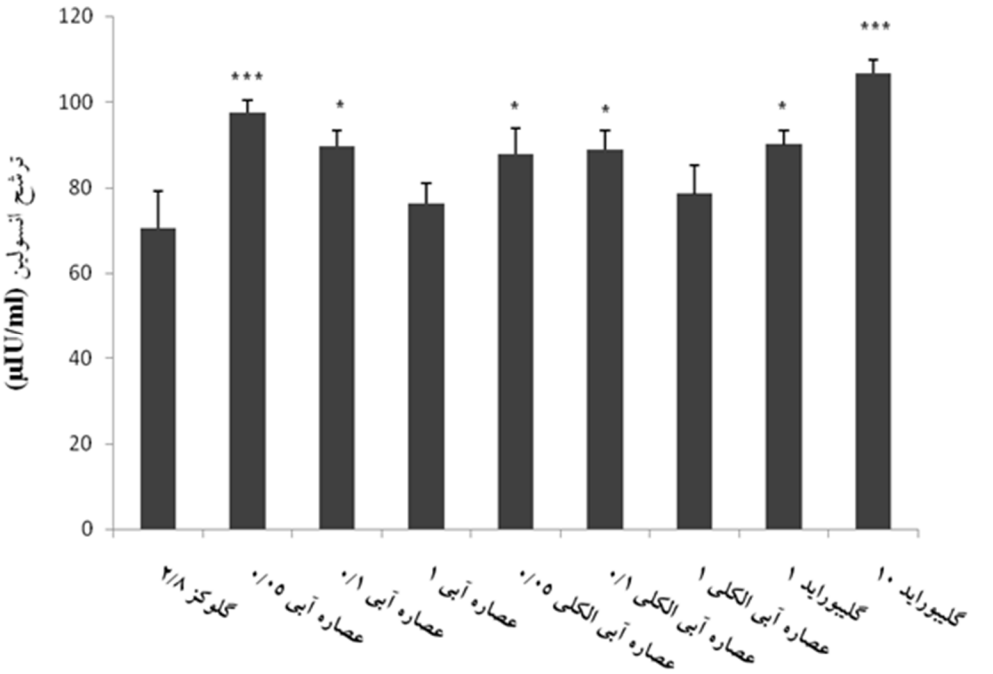
جهت اندازه‌گیری هورمون انسولین از روش ایمونورادیومتریک (IRMA) و کیت DioSource INS-IRMA تهیه شده از شرکت Louvain-La-Neuve بلژیک با مقدار حساسیت ۱μIU/ml استفاده شد.

در بررسی و تحلیل آماری نتایج از نرم افزار آماری SPSS و روش‌های آماری مناسب استفاده شد. نتایج به صورت mean±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 مقادیرp کوچکتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

یافته‌ها

اثر عصاره آبی‌الکلی و آبی دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت پایه گلوکز۲/۸mM:

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که میزان ترشح انسولین درگروه‌های دریافت‌کننده غلظت (۰/۰۵mg/ml و ۰/۱) عصاره آبی‌الکلی دانه زیره سیاه به ترتیب ۸۷/۷۱±۶/۱۹ ، ۸۸/۸۸±۴/۳۱ (p<۰/۰۵) در مقایسه با گروه غلظت پایه گلوکز(۲/۸mM) ۷۰/۵۹±۸/۷ افزایش یافت. این افزایش در گروه‌های دریافت‌کننده غلظت (۰/۰۵mg/ml و ۰/۱) عصاره آبی دانه زیره سیاه به ترتیب ۹۷/۵۱±۳/۲ (p<۰/۰۰۱) ، ۸۹/۷۱±۳/۷۲ (p<۰/۰۵) نیز مشاهده گردید. همچنین در گروه‌های شاهد گلیبوراید(۱μM) ۹۰/۰۱±۳/۲۲ (p<۰/۰۵) و گلیبوراید(۱۰μM) ۱۰۶/۶۶±۳/۰۸ (p<۰/۰۰۱) مقدار ترشح انسولین توسط جزایرجداسازی شده به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه غلظت پایه گلوکز افزایش پیدا نمود (نمودار۱).



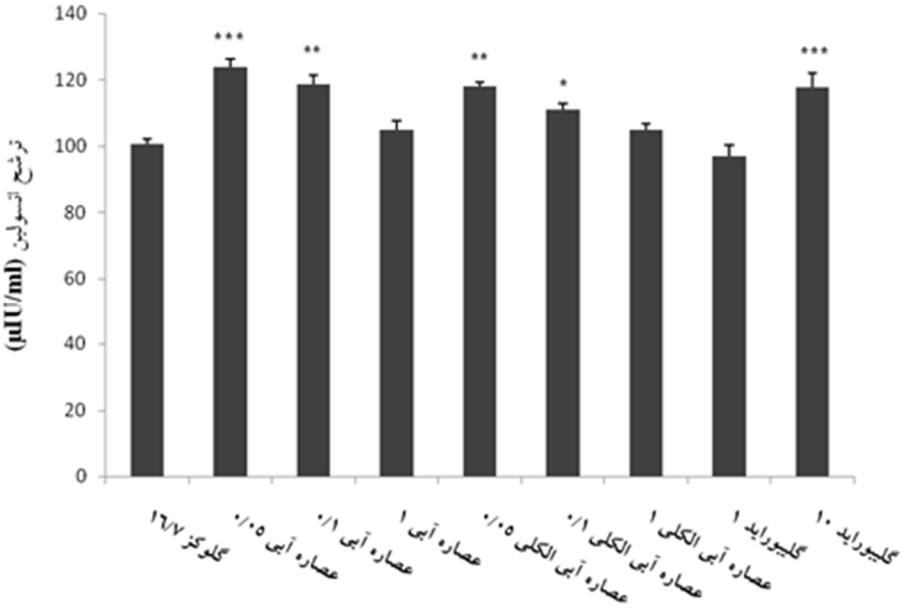
نمودار (۱): اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی، آبی‌الکلی دانه زیره سیاه(mg/ml) و گلیبوراید(μM) بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداشده در حضور غلظت گلوکز ۲/۸mM

(n=۷، *= p<۰/۰۵ ، ***=p<۰/۰۰۱ (درمقایسه با گروه غلظت گلوکز ۲/۸mM))

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

اثر عصاره آبی‌الکلی و آبی دانه زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز۱۶/۷mM:

ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در غلظت های ۰/۰۵mg/ml (۱۱۷/۹۱±۱/۴۶) (p<۰/۰۱) و ۰/۱mg/ml (۱۱۱/۰۳±۱/۷۶) (p<۰/۰۵) از عصاره آبی‌الکلی این دانه و غلظت‌های ۰/۰۵mg/ml (۱۲۳/۷۷±۲/۵۶) (p<۰/۰۰۱) و ۰/۱mg/ml(۱۱۸/۷۴±۲/۷۸) (p<۰/۰۱) از عصاره آبی دانه زیره سیاه و غلظت گلیبوراید(۱۰μM) (۱۱۷/۶۶±۴/۲۷) (p<۰/۰۰۱) در مقایسه با غلظت تحریکی گلوکز۱۶/۷mM (۱۰۰/۴۷±۱/۷۵) افزایش یافت. اما استفاده از گلیبوراید(۱μM) (۹۶/۸۷±۳/۴۵) تغییر معنی داری در ترشح انسولین از جزایر جداسازی شده در محیط حاوی گلوکز۱۶/۷mM ایجاد ننمود (نمودار۲).



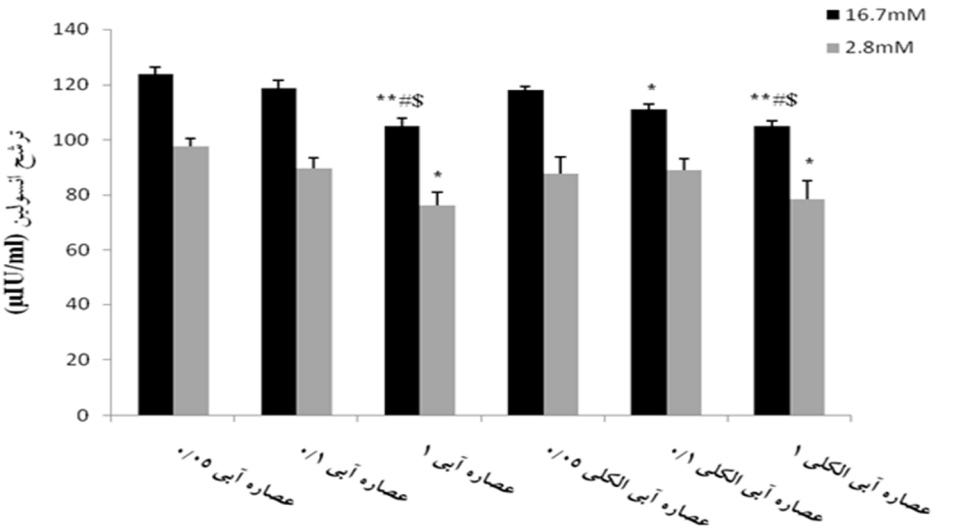
نمودار (۲): اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی، آبی‌الکلی دانه زیره سیاه(mg/ml) و گلیبوراید(μM) بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداشده در حضور غلظت گلوکز ۱۶/۷mM

(n=۷ ، *= p<۰/۰۵ ، ××=p<۰/۰۱، ***=p<۰/۰۰۱ (درمقایسه با گروه غلظت گلوکز ۱۶/۷mM))

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 ۲/۸mM و تحریکی گلوکز۱۶/۷mM:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مقدار ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در غلظت ۰/۰۵mg/ml از عصاره آبی دانه زیره سیاه در محیط حاوی غظت پایه گلوکز، در مقایسه با غلظت ۱mg/ml از عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی این دانه افزایش معنی‌داری پیدا کرد (p<۰/۰۵). 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 ۱mg/ml (p<۰/۰۱) عصاره آبی، ۰/۱mg/ml (p<۰/۰۵) و ۱mg/ml (p<۰/۰۱) عصاره آبی‌الکلی گردید. مقدار ترشح انسولین در غلظت ۰/۱mg/ml از عصاره آبی دانه زیره سیاه در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز اختلاف معنی‌داری را نسبت به غلظت ۱mg/ml از عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی این دانه از خود نشان داد (p<۰/۰۵). در نهایت غلظت ۰/۰۵mg/ml از عصاره آبی الکلی در محیط حاوی غلظت تحریکی گلوکز باعث افزایش ترشح انسولین جزایر لانگرهانس در مقایسه با غلظت ۱mg/ml (p<۰/۰۵) از عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی شد (نمودار۳).

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018



نمودار (۳): مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره آبی و آبی‌الکلی زیره سیاه بر میزان ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداسازی شده در حضور غلظت‌های پایه ۲/۸mM و تحریکی گلوکز۱۶/۷mM

(n=۷ ، *=p<۰/۰۵، **=p<۰/۰۱ در مقایسه با عصاره آبی ۰/۰۵mg/ml؛ #=p<۰/۰۵، در مقایسه با عصاره آبی ۰/۰۱mg/ml؛ $=p<۰/۰۵، در مقایسه با عصاره آبی‌الکلی ۰/۰۵mg/ml)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر بیانگر این مطلب بود که عصاره‌های آبی و آبی‌الکلی 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 می تواند احتمالا ناشی از اثرات سمی این عصاره در غلظت های 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 تحقیقR Shafiee Nick و همکاران (۲۸) بر عصاره گیاه کلمپوره انجام دادند مشخص شد که غلظت های پایین (۰/۰۵ و ۰/۱درصد) عصاره آبی الکلی این گیاه منجر به افزایش ترشح انسولین از جزایر جداشده می گردد اما غلظت بالای (۱درصد) این عصاره نتوانست افزایشی در ترشح انسولین بوجود آورد همچنین در بررسی Pournour Mohamadi SHو همکاران (۱۹)، افزایش ترشح انسولین در غلظت های پایین (۰/۰۵mg/ml) عصاره برگ گیاه زیتون .Olea Europaea L به اثبات رسید اما این افزایش در غلظت های (۰/۱mg/mlو۱) مشاهده نگردید بنابراین این موضوع نشان می دهد که غلظت های 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 فلاونوییدها می‌باشند و اثبات اثر فلاونوییدها 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 احتمالا اثر افزاینده ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس توسط این دانه ناشی از تأثیر فلاونوییدهای 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 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 بررسی های بیشتری می باشد(۳۱). در مطالعه‌ای Patil SB و همکاران بر زیره سبز انجام دادند مشخص

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

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 افزاینده 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 می باشد، به‌گونه‌ای که غلظت ۰/۰۵mg/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. گلیبورایدِ از داروهای ضددیابتی، 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 دپولاریزه 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 (۱μMو۱۰) استفاده شد و درنهایت مشخص گردید که غلظت ۱۰μM این دارو سبب افزایش ترشح انسولین در مقایسه با گروه‌های غلظت پایه و تحریکی گلوکز و غلظت ۱μM 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 ۱μMو۱۰ داروی گلیبوراید منجر به افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس جداشده در محیط حاوی غلظت پایه گلوکز گردید علاوه بر این غلظت ۱μM 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 (۰/۰۵mg/ml و ۰/۱) با گلیبوراید ۱μM مشخص گردید که این غلظت از عصاره‌ها اثری مشابه با داروی گلیبوراید۱μM 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 گلیبوراید۱۰μM 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 جزایرلانگرهانس بوده و این اثر همانند تأثیر داروی گلیبوراید۱μMدرغلظت پایه گلوکز و گلیبوراید ۱۰μM در غلظت تحریکی گلوکز می‌باشد. در این میان بیشترین پاسخ افزایشی بر ترشح انسولین در غلظت ۰/۰۵mg/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 ۹۱s.۶۶ می باشد 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 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, Larijani B, Abdollahi M. A systematic review of Iranian medicinal plants useful in diabetes mellitus. Arch Med Sci 2008; 4, 3: 285–92.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

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. Haghirossadat 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. Ziyyat 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, Oroojan AA. The effects of Cassia italica leaves aqueous extract on non-

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

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 secration 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. 1. 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 hydroalcohlic 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.

Original Article

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

*Akram Ahangarpour[1], Ali Akbar Oroojan[*2], Hamid Heydari[3], Iraj Ahmadi[4]*

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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 7:37 +0430 on Tuesday June 19th 2018

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: (glucose2.8mM and 16.7mM), aqueous and hydro-alcoholic extracts of *B. persicum* seeds (0.05, 0.1, 1mg/ml) and glyburide (1, 10µM). 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 glucose2.8 mM and 16.7 mM increased significantly in comparison with glucose2.8 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, glyburide10µM showed most effective in increasing insulin secretion from isolated islets in comparison with glucose2.8mM 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 glyburide1µM on the secretion of this hormone in glucose2.8mM medium as well as glyburide10µM in glucose16.7mM 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_oroojan@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 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*