

اثر تجویز خوراکی و درازمدت سیاه‌دانه بر پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای در موش صحرایی دیابتی

مهرداد روغنی^{*1} (Ph.D)، توراندخت بلوچ‌نژاد مجرد² (Ph.D)، محمدرضا واعظ‌مهدوی¹ (Ph.D)، محمد واسعی¹ (M.D)

۱- دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

۲- دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: تیمارهای دارویی به‌ویژه استفاده از گیاهان دارویی با حداقل عوارض جانبی که بتواند از بروز عوارض وخیم بیماری دیابت قندی در درازمدت جلوگیری نماید، از اهمیت بالینی زیادی برخوردار می‌باشد. لذا با توجه به وجود شواهد متعدد مبنی بر اثر ضددیابتی سیاه‌دانه، در این تحقیق اثر حفاظتی تجویز خوراکی سیاه‌دانه (*Nigella sativum*) بر پاسخ انقباضی آئورت سینه‌ای در مدل تجربی دیابت قندی در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی نر (به تعداد ۳۲ سر) به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با سیاه‌دانه، دیابتی درمان نشده و دیابتی درمان شده با سیاه‌دانه تقسیم شدند. برای دیابتی نمودن حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین به‌طور داخل صفاقی استفاده گردید. دو گروه تحت تیمار با سیاه‌دانه نیز پودر مخلوط شده این گیاه با غذای استاندارد موش (۶/۲۵٪) را به مدت ۲ ماه دریافت نمودند. پاسخ انقباضی وابسته به غلظت حلقه‌های آئورتی دارای اندوتلیوم به کلرور پتاسیم و نورآدرنالین پس از گذشت دو ماه ثبت گردید.

یافته‌ها: پاسخ انقباضی به کلرور پتاسیم و نورآدرنالین در مورد حلقه‌های آئورتی برای کلیه گروه‌ها از یک فرم وابسته به غلظت تبعیت نمود. حداکثر پاسخ انقباضی به کلرور پتاسیم و نورآدرنالین در گروه دیابتی درمان نشده، به‌طور معنی‌دار ($P < 0/001$) بیش‌تر از گروه کنترل بود. بعلاوه حداکثر پاسخ انقباضی در مورد گروه‌های دیابتی تحت تیمار با سیاه‌دانه به‌طور معنی‌دار کم‌تر از گروه دیابتی درمان نشده بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: مصرف خوراکی سیاه‌دانه در درازمدت می‌تواند در کاهش دادن پاسخ انقباضی سیستم عروقی در حالت دیابت و احتمالاً در جهت کاهش برخی عوارض قلبی-عروقی ناشی از آن مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: سیاه‌دانه، سیستم عروقی، دیابت قندی، پاسخ انقباضی، موش صحرایی

مقدمه

نامطلوب دیگر در درازمدت نظیر رتینوپاتی، گرفتاری عروقی، نوروپاتی، ضایعات پوستی و اختلالات سیستم قلب و گردش خون همراه می‌باشد [۲]. در بیماری دیابت قندی عوامل مختلف شامل افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن به‌علت افزایش سطح گلوکز خون و تشدید پراکسیداسیون لیپیدی موجب افزایش بروز آترواسکلروز و بیماری‌های

بیماری دیابت قندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های سیستم غدد درون‌ریز بدن محسوب می‌شود که بر اساس پیش‌بینی به‌عمل آمده، شیوع آن در جامعه انسانی در آینده افزایش خواهد یافت [۱]. کم‌بود یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری، با عوارض متابولیکی حاد و مزمن و عوارض

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۶۴۷۹۲ - ۰۲۱، شماره: ۰۲۱-۸۸۹۶۶۳۱۰ - ۰۲۱، E-mail: mehjour@yahoo.com

ایمنی در مدل تجربی دیابت قندی در حیواناتی نظیر هامستر می‌باشد [۸]. از طرف دیگر اثرات رلاکسانت عصاره آبی و الکلی سیاه‌دانه بر حلقه‌های ایزوله تراشه خوکچه هندی مورد تأیید قرار گرفته است [۹]. هم‌چنین تجویز عصاره سیاه‌دانه موجب رژراسیون و تکثیر نسبی سلول‌های بتا در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط استرپتوزوتوسین در حالت *In vitro* می‌گردد [۱۰]. با توجه به این‌که استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و تشدید گلیکوزیلاسیون سوبسترهای هدف یکی از دلایل بروز تغییرات در سیستم قلب و گردش خون در حالت دیابت قندی در نظر گرفته می‌شود [۱۱]، لذا هدف تحقیق حاضر بررسی اثر مصرف خوراکی سیاه‌دانه (*Nigella sativa L.*) به مدت ۲ ماه بر پاسخ‌گویی انقباضی آئورت سینه‌ای موش صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار به تعداد ۳۲ سر (انستیتو پاستور ایران، تهران) در محدوده وزنی $285 \pm 8/6$ (میانگین \pm خطای معیار) گرم در شروع بررسی استفاده گردید. تمام حیوانات در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد در گروه‌های ۳ تا ۴ تایی در هر قفس قرار داده شدند. در ضمن حیوانات آزادانه به آب لوله‌کشی و غذای مخصوص موش و یا غذای مخلوط شده با سیاه‌دانه به نسبت مشخص به مدت ۲ ماه دسترسی داشتند. به منظور حصول حالت سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات به انجام رسید.

روش تهیه غذای حاوی سیاه‌دانه به این صورت بود که پس از تهیه دانه سالم گیاه و اطمینان از سلامت ظاهری و تأیید علمی و آسیاب نمون، پودر به‌دست آمده با یک نسبت وزنی ۶/۲۵٪ با غذای پودر شده و استاندارد موش مخلوط و مجدداً غذای *Pelleted* تولید گردید [۱۲]. در این بررسی از آن دسته موش‌های صحرایی نر استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم

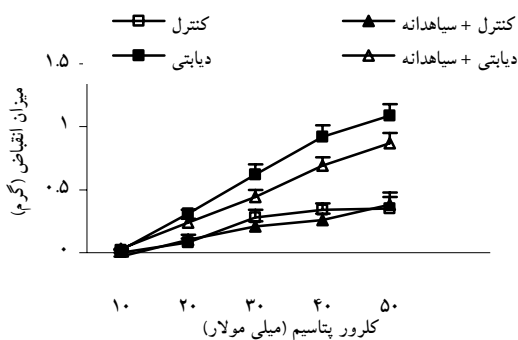
قلبی-عروقی می‌گردد. در همین ارتباط نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که پاسخ انقباضی برخی نواحی عروقی شامل آئورت سینه‌ای به نورآدرنالین و کلرور پتاسیم در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین به طور معنی‌داری نسبت به حیوانات سالم افزایش می‌یابد، که در این افزایش پاسخ انقباضی عروق عوامل گوناگون از جمله تشدید تولید آندوتلین به عنوان یک منقبض کننده قوی عضلات صاف عروق، افزایش سنتز و ترشح برخی از پروستاگلاندین‌های تنگ‌کننده عروقی، افزایش غلظت داخل سلولی دی‌آسیل‌گلیسرول و افزایش متعاقب کلسیم داخل سلولی به عنوان عامل محرک انقباض در عضله صاف عروقی و کاهش توانائی تولید فاکتورهای گشاد کننده عروقی با منشأ آندوتلیال نظیر نیتریک اکسید می‌تواند مطرح باشد. هم‌چنین پاسخ اتساعی سیستم عروقی دارای آندوتلیوم شامل آئورت در موش‌های صحرایی دیابتی به استیل‌کولین به طور محسوس کم‌تر از موش‌های صحرایی سالم می‌باشد [۳].

با توجه به افزایش دانش بشری در مورد هتروژنیتسه این بیماری، نیاز برای یافتن ترکیبات مؤثر با حداقل عوارض جانبی در درمان دیابت و اختلالات ناشی از آن شدیداً احساس می‌گردد. گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها اگر چه از دیر باز در درمان دیابت قندی و عوارض ناشی از آن مطرح بوده‌اند، ولی در مورد اثر بخشی قطعی بسیاری از آن‌ها تا کنون شواهد تحقیقاتی و معتبر وجود ندارد [۴]. از این نظر برای سیاه‌دانه و اثرات سودمند آن در بیماری‌های مختلف از جمله امراض متابولیک شواهد متعدد یافت می‌شود. اثرات حفاظتی سیاه‌دانه از نظر کاهش دادن میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تجزیه ذخایر پروتئینی داخل سلول در گلبول‌های قرمز خون تحت شرایط استرس‌زا قبلاً به اثبات رسیده است [۵]. بعلاوه عصاره سیاه‌دانه موجب کاهش یافتن میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و از تخریب سلول‌های بتای جزائر لانگرهانس به‌دنبال تجویز مواد توکسیک نظیر استرپتوزوتوسین و آلوکسان جلوگیری به عمل می‌آورد [۶، ۷]. بعلاوه سیاه‌دانه دارای اثرات هیپوگلیسمیک و تعدیل‌کننده

می‌شد. پس از حصول حالت تعادل، بافت به ترتیب در معرض غلظت‌های افزایش‌یابنده کلرور پتاسیم (10^{-10} تا 50 میلی‌مولار) و نورآدرنالین (10^{-8} تا 10^{-4} مولار) قرار گرفت. برای ثبت و آنالیز داده‌ها نیز از نرم‌افزار Physiograph I (شرکت بهینه‌آرمان، تهران) استفاده گردید. پاسخ انقباضی در تمامی بررسی‌ها به صورت گرم گزارش گردید. از نظر آماری نیز تمامی نتایج به صورت میانگین \pm خطای معیار بیان گردید. برای مقایسه گروه‌ها در مورد نتایج انقباض عروقی از آزمون پارامتریکی One-way ANOVA و Post-hoc test و Tukey's استفاده گردید. بعلاوه سطح معنی‌دار، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

پاسخ انقباضی به کلرور پتاسیم و نورآدرنالین در مورد حلقه‌های آئورتی دارای اندوتلیوم پس از گذشت ۲ ماه برای کلیه گروه‌ها از یک فرم وابسته به غلظت تبعیت نمود (اشکال ۱ و ۲).



شکل ۱. پاسخ انقباضی حلقه ایزوله آئورت سینه‌ای موش صحرایی به غلظت‌های افزایش‌یابنده کلرور پتاسیم در گروه‌های مختلف پس از گذشت ۲ ماه. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. $P < 0.05$ * (در مقایسه با گروه دیابتی)

در این ارتباط، حداکثر پاسخ انقباضی برای کلرور پتاسیم (غلظت 50 میلی‌مولار) و نورآدرنالین (غلظت 10^{-4} مولار) تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه کنترل و کنترل تحت تیمار با سیاه‌دانه نشان نداد. از طرف دیگر، حالت دیابت موجب افزایش پاسخ‌گویی حلقه‌های آئورتی به کلرور پتاسیم و

آن‌ها پائین‌تر از حد 250 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود. موش‌ها به طور کاملاً تصادفی به چهار گروه کنترل، گروه کنترل دریافت کننده سیاه‌دانه، گروه دیابتی و گروه دیابتی دریافت کننده سیاه‌دانه تقسیم شدند. برای دیابتی نمودن حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت تک‌دوز و داخل صفاقی به میزان 60 میلی‌گرم بر کیلوگرم حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد استفاده گردید. حجم محلول تزریقی به هر حیوان حدود 0.5 میلی‌لیتر بود. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (زیست شیمی، تهران) قبل از انجام کار و در پایان ماه‌های اول و دوم به انجام رسید.

پس از گذشت ۲ ماه، موش‌ها با استفاده از اتر بی‌هوش شده، با باز کردن قفسه‌سینه آئورت سینه‌ای جدا و در داخل محلول کربس (که به طور مداوم به‌داخل آن گاز کربوژن 95% اکسیژن و 5% دی‌اکسیدکربن) دمیده می‌شد) قرار داده شد. ترکیب شیمیایی محلول کربس مورد استفاده در تمام آزمایش‌ها به قرار زیر بود (بر حسب میلی‌مولار) [۱]:

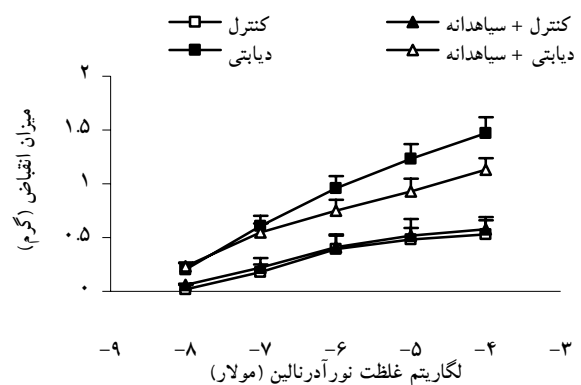
NaCl, $118/5$; KCl, $4/74$; $CaCl_2$, $5/2$; $MgSO_4$, $1/18$; $NaHCO_3$, $24/9$; KH_2PO_4 , $1/18$; Glucose, 10

در داخل محلول کربس سرد، آئورت به دقت از بافت پیوندی اطراف پاک شده، سپس به حلقه‌هایی به طول حدود 4 میلی‌متر تقسیم می‌گردید. برای حصول اطمینان از سلامت اندوتلیوم، پس از ایجاد انقباض با غلظت 10^{-6} مولار نورآدرنالین، استیل‌کولین با غلظت 10^{-5} مولار به حمام بافت اضافه می‌شد. مشاهده پاسخ شل‌شدگی بیش‌تر از 30% در حلقه‌های آئورت به‌عنوان ملاک سالم بودن اندوتلیوم در نظر گرفته شد [۱۳،۳]. برای ثبت پاسخ‌گویی حلقه‌های آئورتی، آن‌ها به کمک سیم‌های پلاتینی L شکل که به موازات هم قرار می‌گرفتند، از یک طرف به قلاب شیشه‌ای و از طرف دیگر به ترانس‌دیوسر ایزومتریک F-60 متصل می‌شدند. در این بررسی کشش استراحتی (Resting tension) اعمال شده به حلقه‌های آئورتی، 2 گرم بود. پس از اعمال این کشش، 60 تا 90 دقیقه به بافت اجازه داده می‌شد تا وضعیت ثابت پیدا کند. محلول کربس داخل حمام بافت هم هر 30 دقیقه تعویض

قطعی وجود ندارد، ولی برخی از نتایج به دست آمده، خود هیپرگلیسمی و تشدید استرس اکسیداتیو ناشی از آن را دلیل بروز این عوارض می‌دانند [۱۱]. مطالعات اخیر نشان داده است که در دیابت قندی اختلال متابولیسم گلوکز و گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها سبب تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژنی می‌شوند، که افزایش رادیکال‌های آزاد و کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در ایجاد آتروسکلروز و افزایش نفوذپذیری و اسکروز عروق خونی دارند. بعلاوه در بیماران دیابتی، تولید رادیکال‌های آزاد از طریق اتواکسیداسیون گلوکز، فعال شدن مسیر سیکلوآکسیژناز و تولید اکسیژن فعال به وسیله کربوهیدرات و چربی‌ها افزایش می‌یابد [۱۳]. نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که پاسخ انقباضی حلقه‌های آئورتی دارای آندوتلیوم به نورآدرنالین و کلرور پتاسیم در موش‌های صحرایی نر دیابتی به طور معنی‌داری نسبت به حیوانات سالم افزایش یافته است که با نتایج قبلی سایر محققان مطابقت دارد [۳].

در بررسی حاضر هم‌چنین مشخص گردید که مصرف خوراکی سیاه‌دانه به مدت ۲ ماه توسط موش‌های دیابتی می‌تواند موجب کاهش حداکثر پاسخ انقباضی به دنبال اضافه نمودن کلرور پتاسیم و نورآدرنالین در نمونه‌های واجد آندوتلیوم گردد. هر چند که ماهیت شیمیایی مواد فعال موجود در سیاه‌دانه با خاصیت ضددیابتی و محافظت‌کننده عروقی به خوبی شناخته نشده است، ولی احتمالاً اثرات سودمند آن را می‌توان به مواد مؤثره، به‌ویژه فلاونوئیدها با خاصیت آنتی‌اکسیدانت نسبت داد [۱۴]. در این خصوص مشخص شده است که حالت دیابت قندی با افزایش دادن گلیکوزیله شدن سوبستراهای مختلف در نواحی هدف و با وساطت محصولات نهایی و پیشرفته گلیکوزیلاسیون و هم‌چنین از طریق افزایش دادن استرس اکسیداتیو ناشی از تشکیل رادیکال‌های آزاد و فعال اکسیژن و تشدید پراکسیداسیون لیپیدی و تجزیه پروتئین‌ها عوارض جدی را در جامعه افراد دیابتی و در حیوانات دیابتی شده به وجود می‌آورد [۱۱]. لذا این احتمال وجود دارد که گیاهانی نظیر سیاه‌دانه به علت دارا بودن

نورآدرنالین گردید، که با توجه به شواهد موجود مورد انتظار بود. بعلاوه، درمان موش‌های دیابتی با سیاه‌دانه موجب کاهش معنی‌دار در حداکثر پاسخ انقباضی در مورد کلرور پتاسیم و نورآدرنالین در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده گردید؛ بدین صورت که حداکثر پاسخ انقباضی برای کلرور پتاسیم در گروه دیابتی درمان شده $20/1\%$ ($P < 0/05$) و برای نورآدرنالین در همین گروه $23/1\%$ ($P < 0/05$) کم‌تر از گروه دیابتی درمان نشده بود.



شکل ۲. پاسخ انقباضی حلقه ایزوله آئورت سینه‌ای موش صحرایی به غلظت‌های افزایش‌یافته نورآدرنالین در گروه‌های مختلف پس از گذشت ۲ ماه. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. $P < 0/05$ * (در مقایسه با گروه دیابتی)

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بررسی حاضر نشان داد که درمان موش‌های دیابتی با این گیاه موجب کاهش معنی‌دار در حداکثر پاسخ انقباضی به آگونست غیراختصاصی کلرور پتاسیم و آگونست اختصاصی نورآدرنالین در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده می‌گردد. مکانیسم‌های متفاوتی در ایجاد اختلال در ساختمان و عملکرد عروق خونی در دیابت قندی دخالت دارند. در این ارتباط ظرفیت آندوتلیوم عروق در سنتر گشادکننده‌های عروقی مانند پروستاگلندین و نیتریک اکسید کم شده و تنگ‌کننده‌های عروقی مانند آندوتلین به مقدار زیادی تولید می‌شوند. هر چند که در مورد نقش هیپرگلیسمی مزمن در بروز عوارض ماکروواسکولار در حالت دیابت قندی شواهد

- [4] Kuhn M, Winston D. Herbal Therapy and Supplements: A Scientific and Traditional Approach. Philadelphia, Pa: JB Lippincott; 2001. p.85-8.
- [5] Suboh SM, Bilito YY, Aburjai TA. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytother Res*, 2004; 18(4):280-4.
- [6] Kanter M, Coskun O, Korkmaz A, Oter S. Effects of *Nigella sativa* on oxidative stress and beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004; 279(1):685-91.
- [7] Ramadan MF, Kroh LW, Morsel JT. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *J Agric Food Chem*, 2003; 51(24):6961-9.
- [8] Fararh KM, Atoji Y, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Takewaki T. Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Res Vet Sci*, 2004; 77(2):123-9.
- [9] Boskabady MH, Shirmohammadi B, Jandaghi P, Kiani S. Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. *BMC Pharmacol*, 2004; 4:3.
- [10] Kanter M, Meral I, Yener Z, Ozbek H, Demir H. Partial regeneration/proliferation of the beta-cells in the islets of Langerhans by *Nigella sativa* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Tohoku J Exp Med*, 2003; 201(4):213-9.
- [11] Yildirim O, Buyukbingol Z. Effect of cobalt on the oxidative status in heart and aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct*, 2003; 21(1):27-33.
- [12] Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. *Acta Diabetol Lat*, 1989; 26(1):51-5.
- [13] Mori S, Takemoto M, Yokote K, Asami S, Saito Y. Hyperglycemia-induced alteration of vascular smooth muscle phenotype. *J Diabetes Complications*, 2002; 16(1):65-8.
- [14] Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res*, 2003; 17(4):299-305.
- [15] Martin-Nizard F, Sahnaz S, Furman C, Fruchart JC, Duriez P, Bailleul F. Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Planta Med*, 2003; 69(3):207-11.

ترکیبات فلاونوئید با خاصیت آنتی‌اکسیدانت، در کاهش بروز عوارض دیابت در بررسی حاضر مؤثر بوده باشد [۱۴]. در این خصوص مشخص شده است که پلی‌فنل‌ها و فنیل‌پروپانویدهای موجود در این گیاه موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در سطح سلولی و تغییرات نامطلوب عملکردی و ساختمانی در سیستم قلبی عروقی در برخی حالات مرضی نظیر دیابت قندی می‌گردد [۱۵،۷].

به‌طور خلاصه، نتیجه‌گیری می‌شود که مصرف خوراکی و درازمدت سیاه‌دانه در کاهش دادن پاسخ انقباضی سیستم عروقی و احتمالاً در جلوگیری از بروز هیپرتانسیون متعاقب، در موش‌های صحرایی دیابتی مؤثر باشد. هم‌چنین انجام تحقیقات وسیع‌تر جهت مشخص نمودن مکانیسم اثر این گیاه در ارتباط با پاسخ انقباضی سیستم عروقی پیشنهاد می‌گردد.

منابع

- [1] American Diabetes Association. Clinical practice recommendation, screening for diabetes. *Diabetes Care*, 1997; 20:22-4.
- [2] Gleckman R, Morr J. Diabetes-related foot infection. *J Contemp Intern Med*, 1994; 6(8):57-64.
- [3] Abebe W, Harris KH, MacLeod KM. Enhanced contractile responses of arteries from diabetic rats to alpha 1-adrenoceptor stimulation in the absence and presence of extracellular calcium. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990; 16(2):239-48.