

القای ترشح انسولین به وسیله فراکسیون استخراج شده از عصاره گیاه گزنه در پریفیوژن جزایر لانگرهانس موش صحرایی و بررسی اثر *in vivo* آن در موشهای سالم و دیابتی

بیژن فرزانی*: استاد بیوشیمی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
داوود احمدوند: کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
صفورا ورداسبی: کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
ژیلا ماژین: کارشناس ارشد بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
شهناز خاقانی: عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: در کتابهای پزشکی قدیمی، عصاره برگ گیاه گزنه برای درمان قند خون بالا توصیه شده است. **روشها:** در این مطالعه با ایجاد سیستم پریفیوژن، تعداد معینی از جزایر لانگرهانس بدست آمده از موش صحرایی (رت) در معرض یک جزء تلخیص شده از عصاره گزنه که با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) جداسازی شده بود، قرار گرفت. سپس برای ارزیابی پاسخ در محیط زنده، جزء فعال جدا شده به درون صفاق رت‌های طبیعی و دیابتی تزریق شد.

یافته‌ها: اندازه‌گیری قابلیت ترشح انسولین به روش ELISA افزایش قابل توجهی در نمونه‌های حاوی جزء جدا شده از عصاره گیاه گزنه ایجاد کرد. تزریق درون صفاقی محلول حاوی ماده مؤثر به موش صحرایی باعث افزایش انسولین در سرم خون حیوان گردید. در آزمایش *in vivo* علاوه بر افزایش انسولین سرم بعد از ۶۰ دقیقه از زمان تزریق، کاهش قند نیز در زمان مشابه در سرم خون مشاهده شد. افزایش انسولین ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق، تقریباً به ۵ برابر میزان اولیه خود رسید. همچنین کاهش قند خون همزمان با افزایش انسولین ایجاد گردید و تا حدودی دامنه تغییرات مشابه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تزریق عصاره گیاه برگ گزنه در موشهای دیابتی شده با استرپتوزوتوسین مشابه موشهای سالم اما دامنه تغییرات نسبت به آنها تا حدودی کاهش یافته بود.

کلیدواژه‌ها: گزنه، پریفیوژن، انسولین، اثر هیپوگلیسمیک، جزایر لانگرهانس، دیابت قندی

مقدمه

آورده شده است. گزارشهای دیگری وجود دارد که گیاه گزنه را در بیماری دیابت (۲،۱) و عوارض دیگر مانند هیپرپلازی پروستات (۳-۶)، التهاب آرتریت روماتوئید (۷)، پرفشاری خون و رینیت آلرژیک (۸)

اثر کاهش‌دهنده قند خون گیاه گزنه (*Urtica dioica*) یا *Stinging Nettle* به عنوان گیاه مؤثر در کاهش قند خون در متون قدیمی پزشکی و در رساله‌های ابن سینا

* تهران، صندوق پستی ۵۳۹۹-۱۴۱۵۵

مورد استفاده قرار داده‌اند. در همه گزارشهای فوق، مکانیسم اثر انسولین ذکر نشده است. در تجارب حاضر نشان داده شده است که کاهش قند خون به علت افزایش ترشح انسولین از منشأ جزایر لانگرهانس می‌باشد.

در این مطالعات با استفاده از روش پرفیوژن جزایر لانگرهانس و به‌کارگیری فراکسیون جداشده به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک در تجربیات *in vitro* و *in vivo*، اثر القا کننده ترشح انسولین به‌وسیله عامل مؤثر در گیاه گزنه مشاهده گردید.

روشها

ماده گیاهی: برگ گیاه گزنه از نواحی شمالی ایران به‌دست آمد و به‌وسیله بخش گیاه‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تهران مورد تأیید قرار گرفت. برگها در حرارت اتاق خشک و به‌صورت پودر درآورده شد.

تهیه عصاره گیاهی: ۱۰ گرم پودر برگ خشک با ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر برای مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. فیلتراسیون از پارچه به‌عمل آمد و سپس مایع از صافی واتمن شماره یک عبور داده شد. حجم محلول با عمل تبخیر در خلاء به ۵/۱ برابر مقدار اولیه رسانده شد و عصاره تغلیظ یافته در ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردید.

جداسازی به‌وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

صفحات ژل سیلیکات کلسیم^۱ (type G) TLC به ضخامت یک میلی‌متر در روی صفحات شیشه‌ای کشیده شد و فعال‌سازی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس انجام گردید. سپس عصاره فوق در دفعات متعدد در امتداد خطی در یک سانتی‌متری

انتهای صفحات قرار داده شد تا غلظت کافی را به‌دست آورد. محلولهای حامل با نسبتهای متفاوتی از حلال ایزوپروپانل و آب به نسبتهای ۲۵٪ تا ۷۵٪ مورد استفاده قرارگرفت.

بهترین جداسازی در مخلوط حلال ایزوپروپانل و آب به نسبت حجمی ۷۰/۳۰ به‌دست آمد. کروماتوگرافی ۷-۱۰ ساعت به‌طول انجامید. صفحات سپس در اتو ۴۵ درجه خشک گردید. با استفاده از اشعه فلورسانس مشخص شد که شش باند حساس به فلورسانس به‌دست آمده است که F1 تا F6 نامیده شدند. باقی باندها و نواحی حد فاصل آنها نیز جداگانه از روی صفحات تراشیده شد و با حلال با نسبت ۳۰/۷۰ ایزوپروپانل و آب به مدت چند دقیقه تکان داده شد. بخش جامد با عمل سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه جدا گردید و مایع رویی در دستگاه تبخیر حلال آلی تبخیر و باقیمانده جامد آن در یک میلی‌لیتر آب حل شد.

آزمایش با حیوان

موشهای نر آلبینو (albino rats) از سویه ویستار (Wistar strain) به وزن ۲۲۰ تا ۲۷۰ گرم در مدت یک هفته قبل از انجام آزمایش با غذای معمول و آب در شرایط مناسب تهویه‌ای در درجه حرارت $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و چرخه ۱۲ ساعت روشنایی - تاریکی نگهداری شدند.

جداسازی جزایر لانگرهانس

جداسازی جزایر لانگرهانس از پانکراس موش صحرایی براساس روش لیزی (Lacy) و کاستیانوفسکی (Kastianovsky) (۹) انجام گردید. طبق این روش بیهوشی ملایمی با اتر داده شد و بعد از باز کردن حفره شکمی، جهت افزایش بازده در

¹ Thin-layer chromatography

نیم میلی‌لیتر از محلول رویی آنها برداشته شد و مقدار انسولین هر لوله به روش الایزا اندازه‌گیری گردید. مقادیر اندازه‌گیری شده با لوله‌های شاهد (Control) که حاوی جزایر و گاز کاربوژن و قند ۲/۸ میلی‌مولار بودند مقایسه شد. در نتیجه تغییرات ترشح انسولین از سلولهای جزایر لانگرهانس در حضور فراکسیون جدا شده بررسی گردید.

آزمایشهای *In vivo*

آماده‌سازی حیوانات

موشها به دو گروه شش تایی تقسیم شدند. بیهوشی با تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید ۵۰ mg/kg و ۰/۲ میلی‌لیتر کلرپرومازین انجام گرفت. به یک دسته از حیوانات به‌عنوان گروه شاهد سرم فیزیولوژی تزریق شد و دسته دوم سرم فیزیولوژی حاوی فراکسیون F1 دریافت داشتند.

آزمون GTT^۱

تمامی حیوانات به مدت ۱۶ ساعت به‌حالت ناشتا نگهداری شدند. محلول گلوکز با غلظت ۱/۲۵ g/kg به‌صورت درون صفاقی تزریق گردید. نمونه‌های خون از شبکه عروق رترواوریتال چشم در لوله‌های هماتوکریت جمع‌آوری شد. جمع‌آوری خون در چند مرحله یکی ۳۰ دقیقه قبل از تزریق و در فواصل زمانی ۳۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه بعد از آن انجام گردید.

اندازه‌گیری قند و انسولین

حدود یک میلی‌لیتر نمونه خون از هر موش در لوله‌های حاوی هپارین تهیه گردید. جداسازی سرم با سانتریفوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. اندازه‌گیری قند خون با روش گلوکز

برداشت جزایر، برای تخریب بافت برون‌ریز و جداسازی جزایر لانگرهانس، محلولهای نمکی هانکس به‌درون مجرای صفراوی تزریق گردید. قطعات پانکراس به وزن حدود ۱۰۰ میلی‌گرم جدا و به قطعات کوچک بریده شد. سپس در داخل لوله آزمایش حاوی محلول KBR-HEPES که دارای ۱۶/۷ میلی‌مولار گلوکز بود، در شرایط سرما اضافه گردید. محتوای لوله آزمایش دو بار در ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای دو دقیقه سانتریفوژ شد و هر بار محلول رویی دور ریخته شد و به‌جای آن حجم مساوی از محلول KBR-HEPES حاوی گلوکز ۱۶/۷ میلی‌مولار که حاوی ۵۰۰ واحد آنزیمی کلاژناز بود، اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه تکان داده شد. از بین رفتن قطعات و رشته‌های بافتی، چسبیدن بافت به دیواره لوله سانتریفوژ و تغییر رنگ آن از نشانه‌های نقطه پایانی هضم می‌باشد. نقطه پایانی هضم به‌وسیله استریومیکروسکوپ و میکروسکوپ فاز کنتراست نیز تأیید گردید. با استفاده از پتری دیش با زمینه سیاه در زیر استریومیکروسکوپ، جزایر به‌رنگ سفید مایل به خاکستری دیده می‌شدند که به‌آسانی از بقیه بافت مشخص گردیدند. جداسازی نهایی و تخلیص جزایر به روش دستچین کردن (Hand picking) انجام گردید بدین معنی که با استفاده از پیپت پاستور جزایر در زیر میکروسکوپ برداشته می‌شد و درون لوله‌های سیلیکونیزه حاوی گلوکز ۲/۸ میلی‌مولار و آلبومین سرم گاوی (BSA) ۳۵٪ قرار داده می‌شد (۱۱، ۱۵).

سوسپانسیون سلولی تهیه‌شده، در لوله‌های متعدد به‌طور یکسان و با حجم یک میلی‌لیتر در هر لوله تقسیم شد و سپس در حضور گاز کاربوژن و قند گلوکز ۲/۸ میلی‌مولار و یک میلی‌لیتر فراکسیون جدا شده از گیاه گزنه، در حمام آب گرم ۳۷ درجه به مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس لوله‌ها سانتریفوژ و

¹ Glucose tolerance test

در دو غلظت قند ۲/۸ و ۱۶/۷ میلی مولار، باعث افزایش ترشح انسولین گردد.

این بررسی برحسب زمان نیز انجام گردید با این ترتیب زمانی که نمونه مورد آزمایش برای سنجش انسولین، در زمانهای مختلف ۳۰ و ۶۰ دقیقه برداشته شد. افزایش مقدار انسولین در محلول قند ۱۶/۷ میلی مولار در ۶۰ دقیقه به حداکثر رسید (شکل ۱).

اثر گاز کاربوژن در نسبت ۵/۹۵٪ CO_2/O_2 با استفاده از دمیدن آرام گاز به درون محلول و در تمام طول مدت انکوباسیون، نشان داد که در ۶۰ دقیقه نمونه‌هایی که گاز در آنها وارد نشده بود، فعالیت ترشحي انسولین کمتری داشتند. با این حال در زمان ۳۰ دقیقه نمونه‌هایی که گاز کاربوژن دریافت نکرده بودند، افزایش فعالیت بیشتری را نشان دادند. این یافته‌ها نشان دهنده اهمیت حضور کاربوژن در دوام حیات سلولی در زمانهای طولانی تر انکوباسیون است. با این همه، افزایش نسبی فعالیت در ۳۰ دقیقه اول می‌تواند مربوط به وجود شرایط عادی سلولی جهت فعالیت ترشحي جزایر باشد.

شش فراکسیون (F1-F6) توسط جذب در پرتوهای ماورای بنفش (UV) و فلورسانس شناسایی گردید.

شکل ۱- اثر افزایش دهنده فراکسیون F1 جدا شده از عصاره گزنه در دو غلظت ۸/۲ میلی مولار و ۱۶ میلی مولار گلوکز در زمانهای ۳۰ و ۶۰ دقیقه

اکسیداز و اندازه‌گیری انسولین سرم با کیت ایمونواسی Dako صورت گرفت.

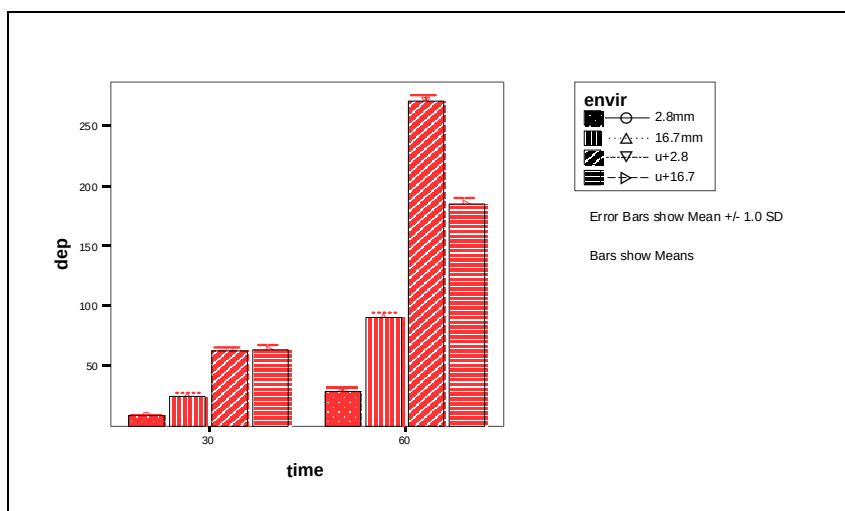
دیابتی کردن حیوانات

پس از ۱۶ ساعت ناشتایی، یک نوبت استرپتوزوتوسین به صورت داخل وریدی به مقدار ۴۰ mg/kg وزن بدن در دم حیوانات تزریق شد. محلول تزریقی حاوی بافر سرد سیترات با غلظت ۱/۰ مولار و $PH = ۴/۵$ بود. بعد از یک هفته قند خون ناشتا اندازه گیری شد. شرایط دیابتی شدن حیوان در صورتی مورد تأیید قرار می‌گرفت که قند خون در محدوده ۲۵۰ mg/dl به دست می‌آمد. آزمایشهای انجام شده دیگر در هر دو گروه حیوانات دیابتی و سالم به صورت مساوی و یکسان انجام گردید (۱۲).

یافته‌ها

In vitro مطالعات

اثر افزایش ترشح انسولین از جزایر لانگرهانس به وسیله عصاره آبی گزنه در روش پریفیوژن: نتایج به دست آمده از پریفیوژن نشان داد که عصاره آبی گزنه قادر است

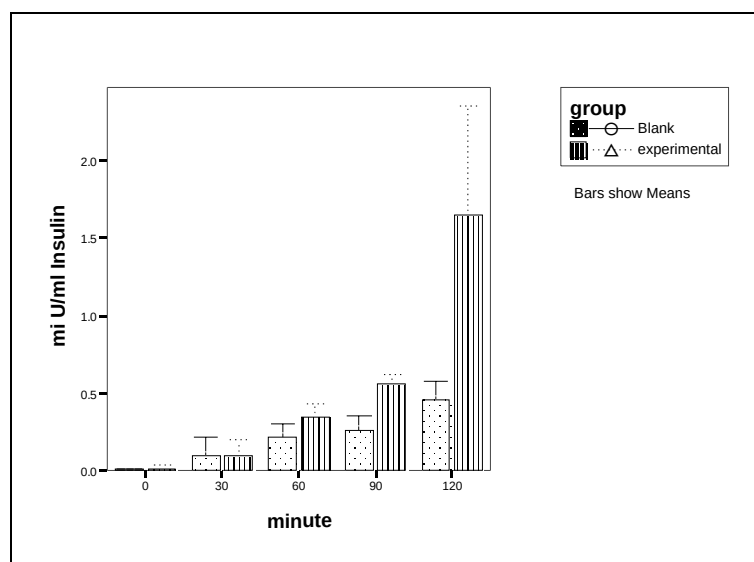


In vivo مطالعات

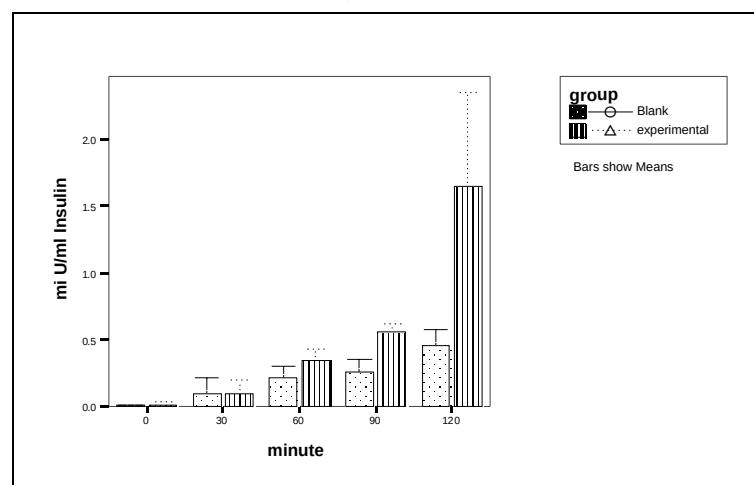
اندازه گیری انسولین و قند سرم با روش ELISA انجام گرفت. تزریق درون صفاتی فراکسیون فعال عصاره گزنه باعث افزایش غلظت انسولین سرم نمونه‌های سالم و دیابتی گردید (شکل‌های ۲ و ۳). این افزایش حدود ۶۰ دقیقه پس از تزریق حاصل گردید ($p < 0.05$).

فراکسیون‌هایی که دارای بیشترین مقدار کمیت Rf بود (F1) بالاترین اثر را در پریفیوژن جزایر نشان داد. بعد از تغلیظ فراکسیون F1 از حاصل کروماتوگرافی‌های مختلف TLC با مخلوط حلال دی‌کلرومتان و سیکلووهگزان به نسبت ۱/۲ V/V انجام گرفت. شش باند جدید حاصل شد که از میان آنها فراکسیون با $RF=0.9$ بیشترین اثر را در افزایش ترشح انسولین نشان داد.

شکل ۲- اثر تزریق درون صفاتی فراکسیون F1 بر افزایش انسولین در موش‌های سالم‌بر حسب زمان خونگیری: الف - سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیون F1 ب - سرم فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیون F1



شکل ۳- اثر تزریق درون صفاتی فراکسیون F1 بر افزایش انسولین در موش‌های دیابتی بر حسب زمان خونگیری: الف - سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیون F1 ب - سرم فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیون F1



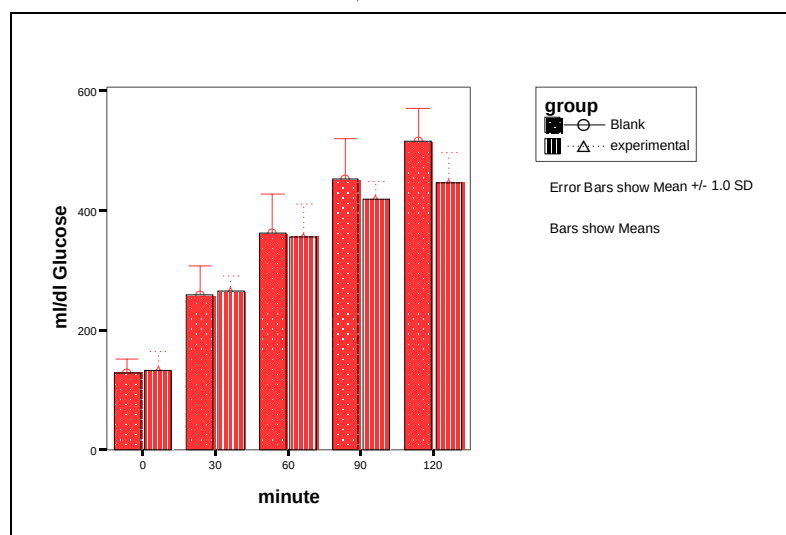
گیاه گزنه (*Urtica dioica*) قادر است باعث افزایش ترشح انسولین در پریفیوژن جزایر و نیز در بدن موش صحرایی گردد. بیشترین اثر در ترشح انسولین بعد از ۶۰ دقیقه از آغاز شروع پریفیوژن حاصل شد و فرایند ترشحات وابسته به غلظت ماده مؤثر بود. در مدت زمان آزمایش اهمیت وجود کاربوژن مشخص گردید به گونه ای که ظاهراً فعالیت جزایر در ۶۰ دقیقه با وجود کاربوژن بیشتر از زمانی بود که کاربوژن در محلول وجود نداشت.

در تمامی نمونه هایی که مورد سنجش انسولین قرار گرفته بود، قند سرم نیز اندازه گیری شد. بعد از زمان ۶۰ دقیقه (همزمان با افزایش انسولین) غلظت قند خون کاهش قابل توجهی پیدا کرد (شکل ۳). نتایج مشابهی در سرم خون نمونه های دیابتی نیز به دست آمد (شکل های ۴ و ۵).

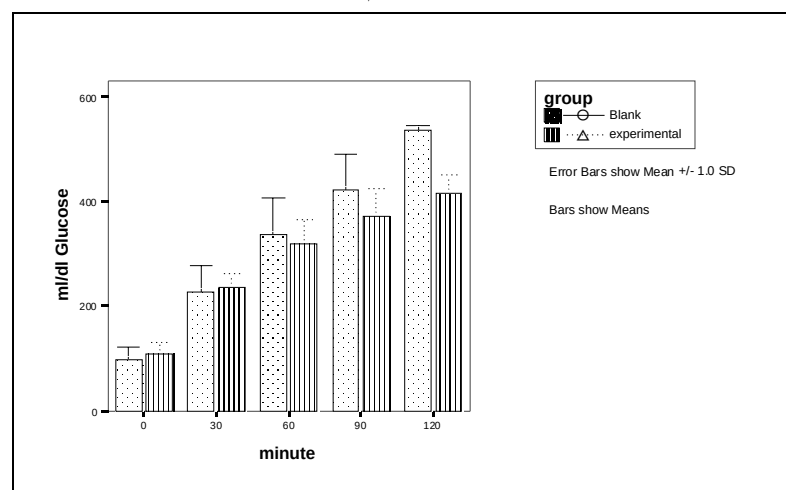
بحث

نتایج این آزمایشها نشان می دهد که عصاره آبی برگ

شکل ۴- اثر تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 بر مقدار قند سرم موشهای سالم برحسب زمان خونگیری: الف - با سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیون F1 ب - با سرم فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیون F1



شکل ۵- اثر تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 بر مقدار قند سرم موشهای دیابتی برحسب زمان خونگیری: الف - با سرم فیزیولوژی قندی بدون فراکسیون F1 ب - با سرم فیزیولوژی قندی حاوی فراکسیون F1

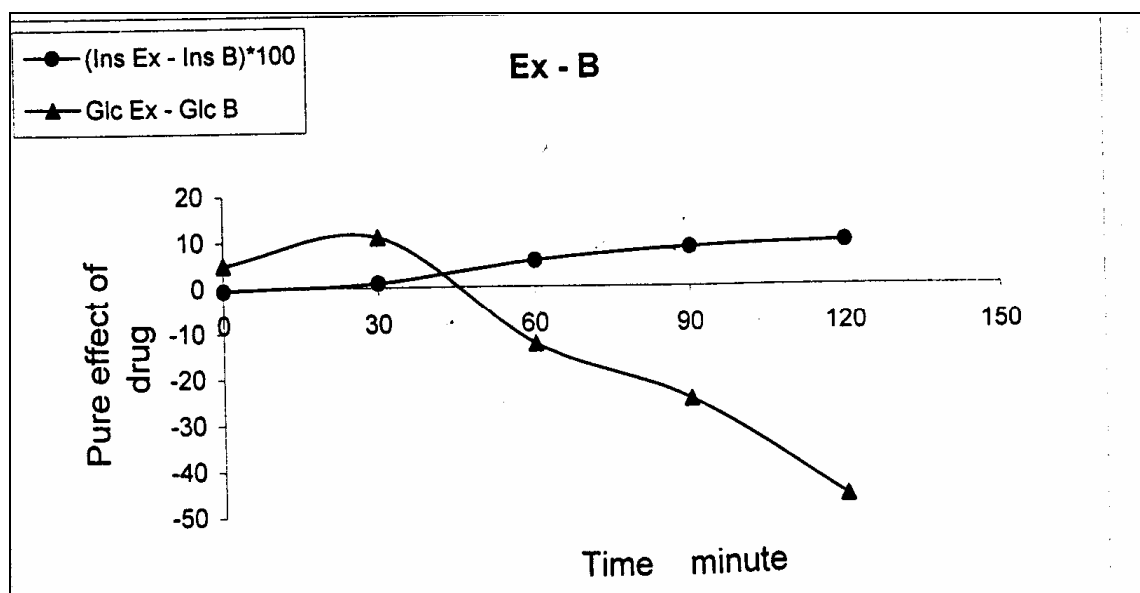


این تفاوت که دامنه اثر آن در موشهای دیابتی اندکی کاهش یافته بود. همچنین افزایش انسولین و کاهش قند خون در حیوانات سالم و دیابتی همزمان و بصورت متقارن صورت گرفت (شکلهای ۶ و ۷).

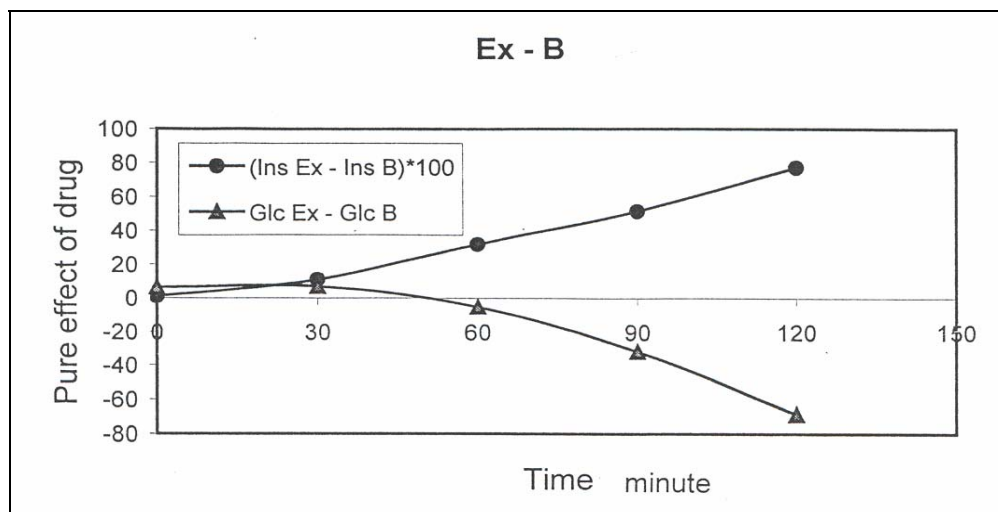
امید است در آینده بتوانیم ساختمان مولکولی ماده مؤثره گیاه گزنه را شناسایی کنیم و احتمالاً نحوه اثر و مکانیسم عمل مولکولی آن را در ترشح انسولین شناسایی نماییم.

در کروماتوگرافی لایه نازک استفاده از دو نوع سیستم حلال آب/ ایزوپروپانول ۳۰/۷۰ باعث جداسازی خالصترین فراکسیون موثر در ترشح گردید. مطالعات *in vivo* نشان داد که فراکسیون خالص شده قادر است افزایش غلظت انسولین سرمی را به مقدار ۵ برابر نرمال افزایش دهد که این نتایج در آزمایشهای *in vitro* به شیوه پرفیوژن جزایر لانگرهانس نیز دیده شد. تزریق درون صفاقی عصاره تخلیص شده در موشهای سالم و موشهای دیابتی اثر مشابهی داشت با

شکل ۶- نمودار تغییرات نسبی الف: انسولین سرم ب: قند خون بعد از تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 در موشهای سالم



شکل ۷- نمودار تغییرات نسبی الف: انسولین سرم ب: قند خون بعد از تزریق درون صفاقی فراکسیون F1 در موشهای دیابتی



مآخذ

1. Roman Ramos R, Alarcon Aguilar F, Lara Lemus A, Flores Saenz JL. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research* 1992; 23: 59-64.
2. Swanston, Flatt SK, Day C, Flatt PR, Gould BJ, Bailey CY. Glycaemic effects of traditional European plant treatment for diabetes: studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice* 1989; 10: 69-75.
3. Kayser K, Bubbenzer J, Kayser G, Eichhorn S, Zemlyanukhinat Bovin NV, Andres S, et al. Expression of lectin, interleukin-2 and histopathologic blood group binding sites in prostate cancer and its correlation with integrated optical density and syntactic structure analysis. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1995; 17: 135-42.
4. Krzeski T, Kazon M, Bordowski A, Witeska A, Kuczera J. Combined extracts of *Urtica dioica* and *pygeum africanum* in treatment of benign prostatic hyperplasia: double-blind comparison of two doses. *Clinical Therapeutics* 1993; 15: 1011-20.
5. Schneider HJ, Honold E, Masuhr T. Treatment of benign prostatic hyperplasia. Results of a treatment study with the phyto-genic combination of Sabal extract WS 1475 and *Urtica* extract WS 1031 in urologic specialty practices. *Fortschritte der Medizin* 1995; 113: 37-40.
6. Hirono T, Homma M, Oka K. Effects of stinging nettle root extracts and their steroidal components on the Na-K ATPase of the benign prostatic hyperplasia. *Planta Medica* 1994; 60: 30-3.
7. Obertreis B, Giller K, Teucher T, Behnke B, Schmitz H. Anti-inflammatory effect of *Urtica dioica* folia extract in comparison to Caffeic malic acid. *Arzneimittel-Forschung* 1996; 46: 52-6.
8. Miltman P. Randomized double-blind study of freeze dried *Urtica dioica* in the treatment of allergic rhinitis. *Planta Medica* 1990; 56: 44-7.
9. Lacy PE, Kostianovsky M, Louis St. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 1967; 16: 35-9.
10. Lacy PE, Finke EH, Conant S. and Naber, S. Long-term perfusion of isolated Rat Islets in Vitro. *Diabetes* 1976; 25: 484-93.
11. Lacy PE, Walker MM, and Fink, C.J., Perfusion of isolated rat Islets in vitro. *Diabetes* 1972; 21: 987-98.
12. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation* 1969; 48: 2129-39.

