

اثر عصاره آبی-الکلی *Ducrosia anethifolia* (Dc.) Boiss. بر بافت قلب جنین موش بزرگ آزمایشگاهی دیابتی

ملیحه کرمی^۱ و فرنگیس قاسمی^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، پست الکترونیک: Ghassemi.fr@gmail.com

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۹

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۹

چکیده

این پژوهش با هدف بررسی اثر عصاره آبی-الکلی برگ گیاه مشگک (*Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss.) بر تغییرات بافت قلب در جنین موش آزمایشگاهی دیابتی انجام شد. بدین منظور ۴۸ سر موش ماده ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرمی با هشت موش نر ۲۳۰ تا ۲۵۰ گرمی لقاح داده شدند. پس از اطمینان از بارداری، ۳۲ سر ماده با تزریق داخل صفاقی ۸۰ میلی‌گرم استریتوزوتوسین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در اولین روز بارداری، دیابتی و به صورت تصادفی گروه‌بندی شدند. گروه‌ها شامل کنترل (موش‌های سالم بدون تیمار)، شاهد ۱ (موش‌های سالم دریافت‌کننده یک میلی‌لیتر عصاره مشگک)، شاهد ۲ (موش‌های دیابتی بدون تیمار)، و سه گروه تیمار که به ترتیب یک میلی‌لیتر از عصاره مشگک با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ کیلوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش دیابتی از روز ۶ تا ۲۰ دوره بارداری به طریق گاواژ دریافت کردند، بودند. روز بیستم بارداری پس از بیهوشی موش‌ها و گرفتن دو میلی‌لیتر خون از قلب آنها، جنین‌ها از رحمشان خارج شدند. قلب جنین‌ها جدا و در محلول ۵٪ فرمالین تثبیت گردید. بعد از آماده‌سازی بافتی، مقاطع پنج میکرونی به روش استریولوژیکی تهیه و با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ‌آمیزی شدند. محیط قلب و ضخامت دیواره آن با نرم‌افزار Image analysis و تعداد سلول‌های قلب با نرم‌افزار Grids-sterio lite اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با آزمون‌های آماری ANOVA تحلیل و میانگین‌ها با آزمون توکی مقایسه شدند ($P \leq 0.05$). یافته‌ها حاکی از افزایش گلوکز خون، تراکم و طول سلول‌های قلبی و محیط قلب در همه گروه‌های دیابتی در مقایسه با کنترل بود که در موش‌های دیابتی تیمار شده با عصاره مشگک در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار کاهش معنی‌دار یافتند. مطابق با نتایج حاصل، عصاره آبی-الکلی برگ مشگک با کاهش گلوکز خون در موش‌های دیابتی، توانست تغییرات تخریبی ناشی از دیابت در بافت قلب و عروق جنین را تا حدودی جبران کند.

واژه‌های کلیدی: قند خون، کاردیوسیت، عصاره مشگک (*Ducrosia anethifolia* (Dc.) Boiss.)، میکرومتری.

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی به قدمت عمر انسان می‌باشد، اما استفاده صحیح از گیاهان دارویی مشروط به وجود اطلاعات دقیق و علمی در مورد آنهاست. تعداد بیشماری از گونه‌های گیاهی موجود در سرتاسر دنیا جزء گیاهان دارویی محسوب می‌شوند (Foroughi et al., 2016). با وجود داروهای صنعتی مختلف برای درمان دیابت، این بیماری هنوز یک معضل سلامتی عمومی به‌شمار می‌رود (American Diabetes Association, 2018). دیابت یک بیماری مزمن هتروژنیک است که با اختلال در ترشح انسولین ناشی از اختلال عملکرد سلول بتا در پانکراس و افزایش مقاومت به انسولین ایجاد می‌شود (Porta et al., 2014). هر درمانی که بتواند دیابت را کنترل و پیشرفت عوارض آن را کند نماید، سهم به‌سزایی در کاهش دردها در بیماران، بهبود کیفیت زندگی آنها و کاهش هزینه‌های تحمیلی خواهد داشت.

یکی از روش‌های دستیابی به این هدف استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد. گیاهان دارویی منبع مهمی از مواد شیمیایی جدید، با اثرهای درمانی بسیار قوی می‌باشند. با توجه به آنکه در بیشتر موارد منشأ و اساس فعالیت این گیاهان ناشناخته مانده است و به‌دلیل گران بودن داروهای سنتتیک و یا عدم دسترسی به این داروها گرایش بیشتری نسبت به گیاهان دارویی وجود دارد. اما ارزیابی اثرهای داروشناسی ترکیب‌های خالص این گیاهان می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد پژوهشی منطقی به‌منظور یافتن داروهای جدید باشد.

گیاه مشگک (*Ducrosia anethifolia* (Dc.) Boiss.) بومی ایران و یکی از گیاهان دارویی است که به‌طور گسترده‌ای در مناطق مختلف حاشیه خلیج فارس، افغانستان، لبنان، عراق و پاکستان رشد می‌کند (Darzi Ramandi et al., 2011). گرچه مشگک به‌عنوان سبزی خوراکی مصرف می‌شود ولی در طب سنتی نیز به‌عنوان دارو توصیه می‌شود (Haghi et al., 2004).

مشگک دارای خاصیت ضد التهابی، درمان‌کننده سردرد،

کمردرد، سرماخوردگی، درمان اضطراب، تشنج و بی‌خوابی (Hajhashemi et al., 2012) و دردهای کولیک (Obidi, 2009) است. بر میکروب‌های گرم مثبت (Mahboubi & Feizabadi, 2013) و مخمرها و برخی درماتوفیت‌ها (Stavri et al., 2003) اثر کشندگی دارد و به‌عنوان شل‌کننده عضلات، تسکین‌دهنده درد و آرام‌کننده سیستم عصبی مرکزی (Darzi Ramandi et al., 2011) و ضد افسردگی معرفی شده است (Shokri et al., 2012; Hajhashemi et al., 2012). همچنین این گیاه در طب نوین به‌دلیل داشتن مونوترپن‌هایی مانند لیمونن و آلفا-پینن، دارای اثرهای ضد اکسیدانی (Mottaghipisheh et al., 2014)؛ (Jasmine et al., 2018; Mottaghipisheh et al., 2018) و ضد دیابتی است (Amiri et al., 2006).

ترکیب‌های تشکیل‌دهنده گیاه مشگک، آلفا-پینن، ساپونین، بتا-پینن، دکانال نرمال، سیترونلول، آپی‌ژنین، دودسن، اسیددکانوئیک از دکانول و فلاونوئیدها هستند (Shalaby et al., 2014). قسمت‌های هوایی گیاه مشگک حاوی آلفاتیک آلدئیدها، مونوترپن‌هایی مانند لیمونن، سیترونلال، ترینولن، میرسن، آلفا-پینن، پولگون، پارا-سیمن و همچنین کومارین‌هایی مانند پنگولین است که خاصیت پاکسازی رادیکال‌های آزاد را داشته (Mottaghipisheh et al., 2018) و به‌طور مؤثری از رشد قارچ‌های پوست انسان جلوگیری می‌کند (Ciftci et al., 2011). اخیراً تحقیقاتی به‌منظور افزایش پایداری اسانس مشگک با ساخت نانولیپوزوم حاوی اسانس آن با توزیع اندازه مناسب برای استفاده در سامانه‌های دارورسانی توسط Salari و Shamsodini (۲۰۲۰) انجام شده که تا حدودی ضعف کاربرد اسانس به علت فرار بودن، عدم پایداری، حلالیت کم و اکسید شدن را جبران می‌کند.

با اینکه تحقیقات گسترده‌ای در رابطه با ترکیب‌های شیمیایی و بررسی این گیاه از دیدگاه گیاه‌شناسی انجام شده ولی هنوز از خواص غذایی و دارویی آن به‌ویژه در بدن موجود زنده، اطلاعات گسترده‌ای در دست نیست. از سویی با مشاهده اثرهای سوء دیابت مادری بر تکوین اندام‌های

وزن تقریبی ۲۵۰-۲۳۰ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری و برای تطابق با محیط دو هفته در شرایط کنترل شده از نظر میزان نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دما (در محدوده 22 ± 3 درجه سلسیوس) و در خانه حیوانات دانشکده علوم پزشکی جهرم نگهداری شدند.

تهیه عصاره آبی گیاه

یک کیلوگرم گیاه مشگک از شهرستان جهرم خریداری و توسط استاد سیستماتیک گیاهی دانشگاه آزاد واحد جهرم (آقای دکتر امیر برجیان) تأیید و در هرباریوم دانشگاه نگهداری گردید. گیاه مذکور را در دمای اتاق (۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد) خشک و پودر کرده، ۴۰ گرم از آن را خیس نموده و در فلاسک حاوی ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول که با فویل پوشانیده شده بود ریخته شد. محصول را روی شیکر با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه مخلوط کرده، سپس مایع حاصل را با کاغذ صافی صاف کرده و برای تغلیظ کردن در دستگاه روتاری اوپراتور (آلمانی) ریخته و تا دمای 250°C حرارت داده شد تا مایع به حجم تقریبی ۳۰ میلی‌لیتر برسد. سپس مایع در دمای آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا خشک شود (Haghi et al., 2004). مایع حاصل تا شروع آزمایش در دمای 4°C نگهداری و پس از تعیین دوز کشنده (۱/۵ گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش)، دوز مناسب مصرفی عصاره مشگک (۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش به‌عنوان دوز حداقل، متوسط و حداکثر) تعیین شد. با قرار دادن موش‌های نر سالم در قفس موش‌های ماده امکان لقاح را فراهم کرده (به‌صورت منوگامی) و صبح روز بعد با مشاهده پلاک واژینال به‌عنوان نشانه بارداری و روز صفر بارداری موش‌های ماده در نظر گرفته شد.

پس از اطمینان از باردار بودن موش‌ها، با تزریق داخل صفاقی و تک دوز ۸۰ میلی‌گرم استریتوزوتوسین ساخت شرکت Merck آلمان در بافر سیترات و در $\text{pH}=4/5$ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش در اولین روز بارداری گروه‌های موش دیابتی این تحقیق آماده شدند. پس از

جنین و اثر مثبت بعضی گیاهان دارویی و فرهنگ تغذیه سالم در پیشگیری از عوارض سوء این بیماری در جنین، تحقیق بیشتر در رابطه با خواص این گیاه (مشگک) که هم مصرف دارویی و هم غذایی دارد ضروری به نظر می‌رسد.

در مادران دیابتی، کاهش انسولین از یک‌سو و افزایش سطح گلوکز خون از سوی دیگر می‌تواند گردش خون جنین را نیز تحت تأثیر قرار داده و بر روند تکامل و تمایز بافت‌های جنینی تأثیر بگذارد (Kohpima et al., 2009)؛ (Gürke et al., 2015). دیابت در دوران بارداری با افزایش عوارض جنینی و نوزادی و حتی با عوارض درازمدت برای کودک همراه است (Hami et al., 2013)؛ (Jasmine et al., 2018). مطالعات انجام شده نشان داده است که دیابت در دوران بارداری خطر ناهنجاری‌های جنین را افزایش می‌دهد (Kamrani Moghaddam et al., 2014).

عوارضی مانند کاردیومیوپاتی، هایپرتروفیک، افزایش ضریب قلب جنین، اتساع حفره‌های بطنی و غیره در نتیجه ابتلای مادر به دیابت گزارش شده است (Noorafshan et al., 2013). رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از دیابت در میتوکندری بافت‌های حساس منجر به اختلال در تشکیل عروق جنین شده و علاوه بر اختلال در خون‌رسانی و افزایش مرگ و میر آنها، در توزیع آهن در بدن جنین نیز اختلال ایجاد کرده که عوارض سوء آن حتی بعد از تولد گریبان‌گیر کودک می‌شود (Noda et al., 2010).

با بررسی اثر عصاره آبی الکلی گیاه مشگک بر بافت قلب جنین در موش صحرایی دیابتی در این تحقیق و نتایج حاصل از آن، شاید در جهت معرفی این گیاه به‌عنوان مکملی برای کاهش عوارض دیابت بارداری به‌ویژه در افراد باردار که محدودیت استفاده از دارو دارند، گامی مؤثر برداشته شود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این تحقیق، ۴۸ موش بزرگ آزمایشگاهی ماده بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم و ۱۰ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ از همین نژاد با

تهیه مقاطع بافتی و مطالعه آن

پس از شکافتن سینه حیوانات، قلب جنین‌ها جدا و حجم اولیه آن با روش غوطه‌ور کردن در لوله مدرج حاوی آب تعیین شد. سپس قلب‌ها را در محلول فرمالین ۱۰٪ تثبیت نموده و مراحل پاساژ بافتی شامل آبگیری، شفاف‌سازی با گزیلول و قالب‌گیری به‌طور اتوماتیک انجام گردید. با استفاده از میکروتوم دوآر و به‌روش کوالیری، سری برش‌های موازی به ضخامت ۵ میکرون با فاصله ثابت تهیه، سپس با محاسبه مجموع سطح مقطع تمام مقطع و ضرب کردن در ضخامت بین مقاطع حجم نهایی محاسبه شد (Gundersen *et al.*, 1988). مقاطع بافتی بر روی لام قرار داده شد و از اسلایدهای تهیه شده پس از رنگ‌آمیزی با همتوکسیلین و ائوزین با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال مدل نیکون عکس گرفته شد (از هر مقطع ۵ نمای مختلف). روی میکروگراف‌ها علاوه‌بر میکرومتری بافت، کلیه تغییرات بافتی در اسلایدهای گروه شاهد و گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل مطالعه شد.

برای اندازه‌گیری کمی پارامترهای بافتی از جمله محیط قلب، ضخامت دیواره بطن، دهلیز و سپتوم بین بطن‌ها از میکرومتری با عدسی مدرج و همچنین نرم‌افزار Grids- stereo lite استفاده گردید و روی میکروگراف‌های تهیه شده تعداد سلول‌های قلبی و تراکم آن تعیین شد. بدین‌شرح که ۲۰ فریم که هر یک به مساحت $100 \times 100 \mu m^2$ بود روی میکروگراف با استفاده از میکروسکوپ متصل به رایانه دارای نرم‌افزار فوق‌انتخاب و شمارش کل کاردیوسیت‌ها، اندازه هسته کاردیوسیت‌ها و محیط قلب اندازه‌گیری شد. نسبت میانگین تعداد سلول‌ها در سطوح منتخب به‌عنوان میانگین تراکم در نظر گرفته می‌شود. پس از شمارش سلول‌ها با قرار دادن مجموع سلول‌های شمارش شده در فرمول زیر، چگالی عددی سلول‌ها بدست می‌آید.

گذشت ۷۲ ساعت از تزریق استرپتوزوتوسین، گلوکز خون موش‌ها با استفاده از دستگاه آزمایش قند "check-Accu مدل Active ساخت کشور آلمان با گرفتن یک قطره خون از دم اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از پایداری دیابت، قند خون به‌طور یک روز در میان تعیین شد. میزان قند ناشتای بیش از 300 mg/dl ، دیابتی تلقی شده و پایین‌تر از این میزان از گروه‌بندی حذف شدند (Hosseini & Karimzadeh, 2012).

پس از دیابتی شدن موش‌ها، به‌صورت تصادفی به ۶ گروه ۸ تایی به‌شرح زیر تقسیم شدند.

۱- گروه کنترل: بدون دریافت هیچ دارویی و با تغذیه معمولی

۲- گروه شاهد ۱ موش‌های سالم که از روز ۶ تا روز ۲۰ بارداری عصاره آبی-الکلی مشکک (۱cc) به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

۳- گروه شاهد ۲: موش‌های دیابتی (از روز ۶ تا روز بارداری ۲۰) سرم فیزیولوژی (۱cc) را به‌صورت گاواژ دریافت کردند.

۴- ۶: گروه تیمار ۱ تا ۳: موش‌های دیابتی که به‌ترتیب گروه، دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش از عصاره آبی-الکلی مشکک از روز ۶ تا روز ۲۰ بارداری به‌صورت گاواژ (۱cc) دریافت کردند.

در روز ۲۰ بارداری، موش‌ها را با رعایت مقررات بین‌المللی اخلاق علمی و انجمن حمایت از حیوانات آزمایشگاهی در جار بیهوشی حاوی پنبه آغشته به محلول کلروفروم قرار داده و پس از بیهوش شدن از قلب آنها با استفاده از سرنگ انسولینی ۲cc خون گرفته شد. سپس جنین‌ها از شاخ‌های رحمی آنها خارج گردید. پس از سانتریفیوژ کردن خون با سرعت ۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و جدا کردن سرم، سطح گلوکز خون با روش آنزیمی، با استفاده از کیت مخصوص ساخت شرکت پارس آزمون و به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر سنجیده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از مطالعه و میکرومتری بافت قلب توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و از طریق آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) به‌طور جداگانه تحلیل و با استفاده از آزمون دانکن با یکدیگر مقایسه شدند. مقادیر استفاده شده میانگین \pm خطای انحراف معیار (SEM) و سطح معنی‌دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی میکرومتری قلب جنین ۲۰ روزه در شکل ۱ (A-H)، میزان قند خون موش مادر در شکل ۲ و نتایج بافتی قلب جنین در شکل‌های ۳ و ۴ قابل مشاهده است.

$$N_v = \frac{\sum Q}{\sum p \times h \times a(\text{frame})}$$

N_v : تعداد در واحد حجم است

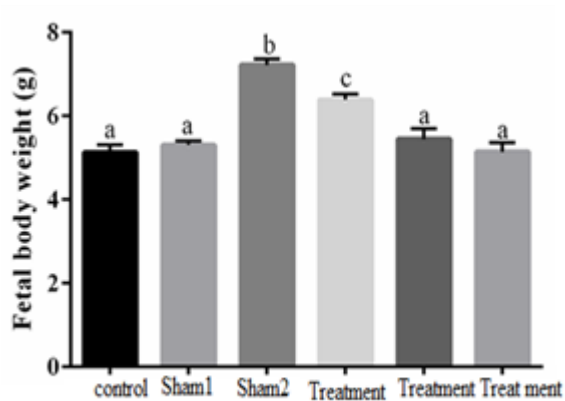
$\sum Q$: تعداد کل سلول‌های شمارش شده

$\sum p$: تعداد فریم‌هایی که سلول‌ها در آن شمارش شده‌اند

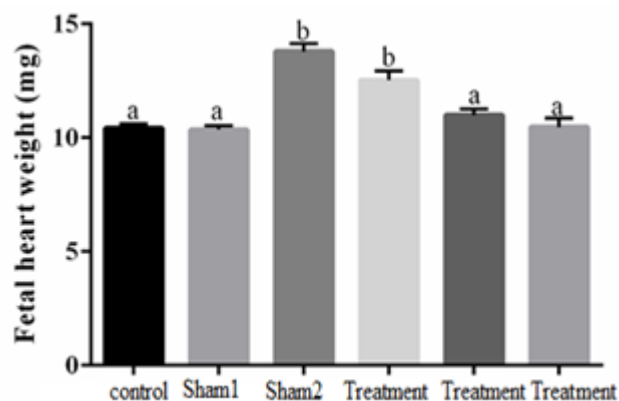
h : ضخامتی که شمارش سلول در آن انجام شده

a/frame : مساحت فریم شمارش

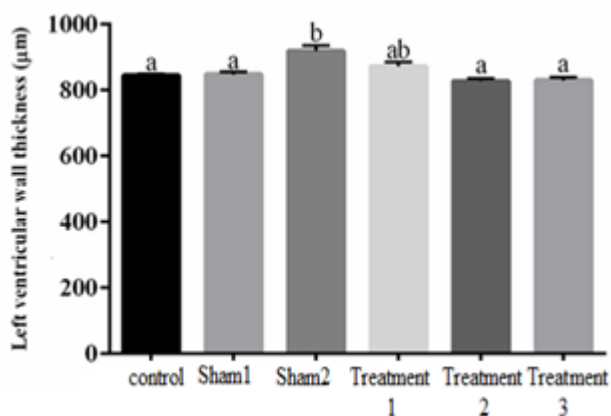
در پایان با ضرب کردن N_v در حجم کل قلب که در بالا از روش کواویری محاسبه شد، تعداد دقیق سلول‌های شمارش شده در کل بافت قلب محاسبه گردید.



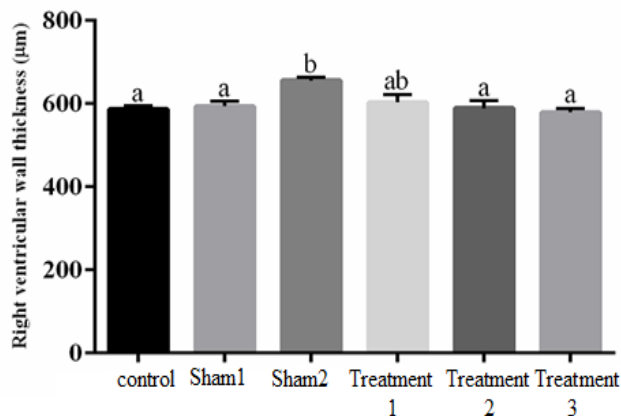
A



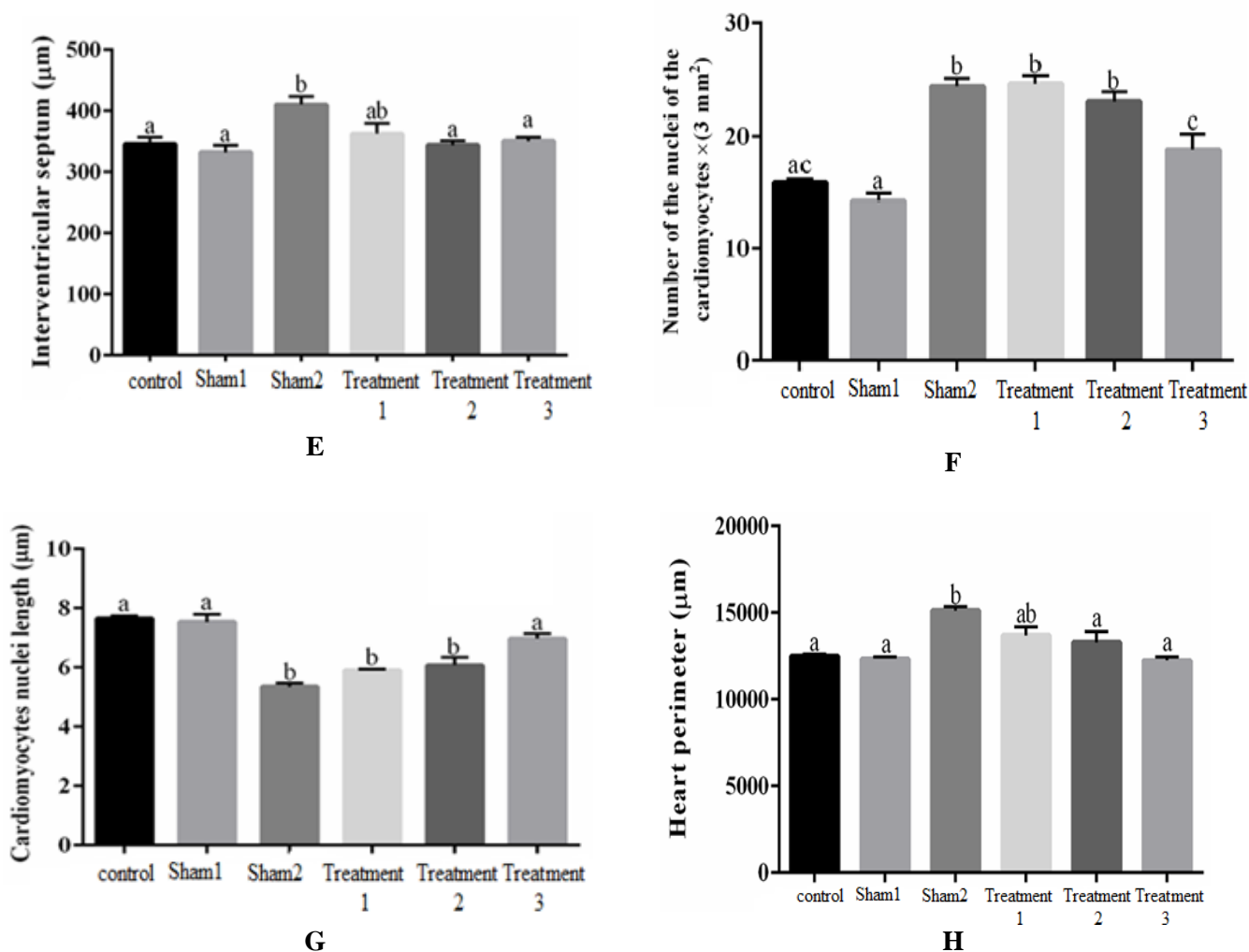
B



C



D



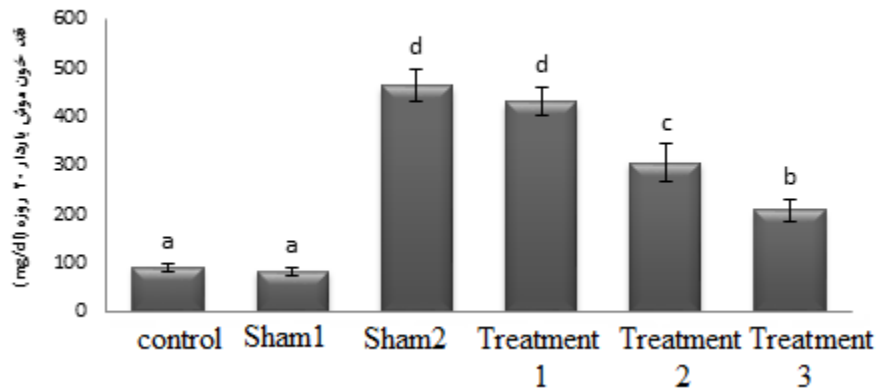
شکل ۱- نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن قلب و میکرومتری آن در گروه‌های مورد بررسی

Control: موش‌های سالم بدون تیمار؛ Sham1 (شاهد ۱): موش‌های سالم مصرف‌کننده عصاره مشگک؛ Sham2 (شاهد ۲): موش‌های دیابتی بدون تیمار؛ Treatment (تیمار ۱-۳): موش‌های دیابتی تیمار شده با دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره مشگک

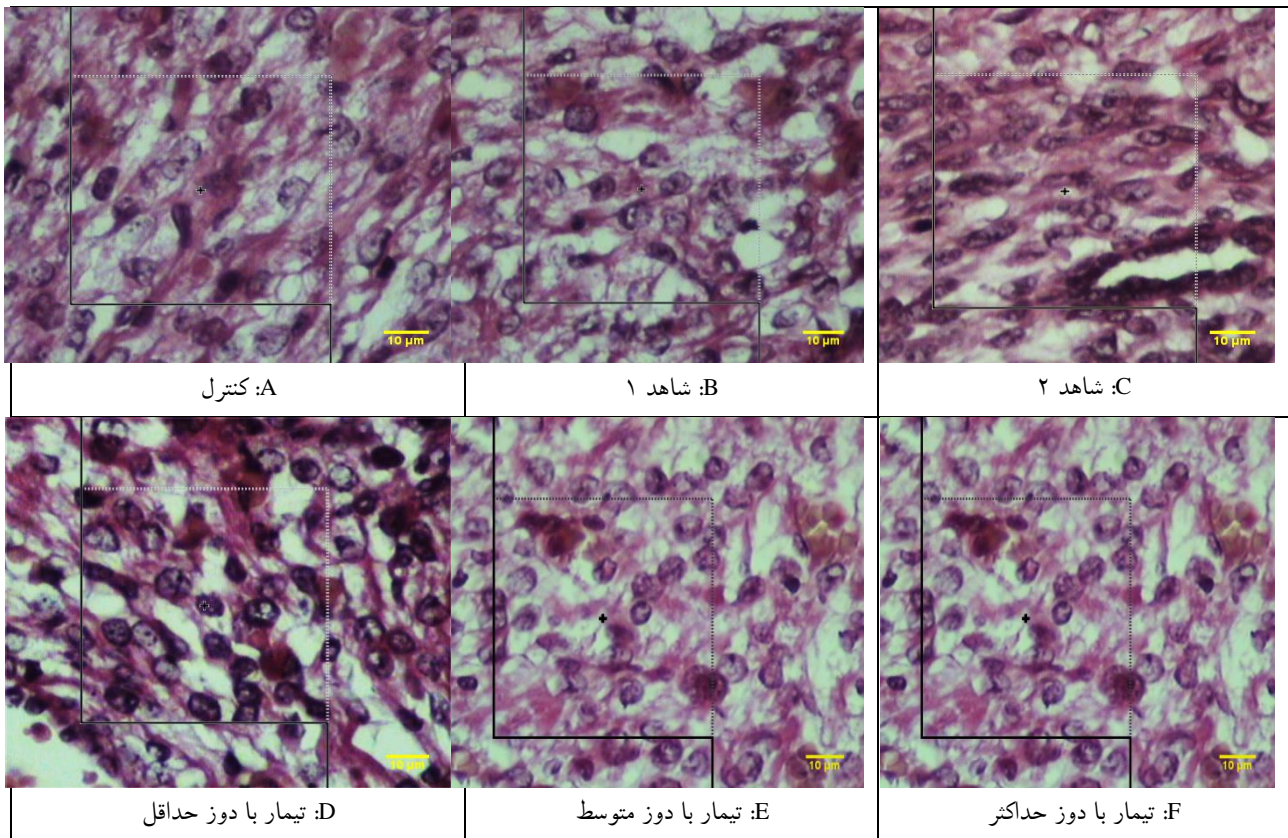
بهبود این تغییرات مشاهده شد.

میزان قند خون ناشتا در گروه شاهد ۲ (دیابتی بدون تیمار) افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نشان داد، به طوری که در گروه‌های تیمار با دوز متوسط و حداکثر عصاره مشگک در سطح معنی‌داری $P < 0.5$ کاهش یافته است اما به سطح گروه کنترل نرسیدند.

کلیه تغییرات ناشی از دیابت در گروه شاهد ۲، با استفاده از داروی گلی‌بن‌کلامید در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) بهبود یافته است. گروه‌های تیمار با عصاره آبی-الکلی مشگک، نتایج مشابه با گروه مصرف‌کننده داروی ضد قند (گلی‌بن‌کلامید) نشان دادند و در بیشتر پارامترها (شکل ۱-F تا شکل ۱-G) اثر قویتری در



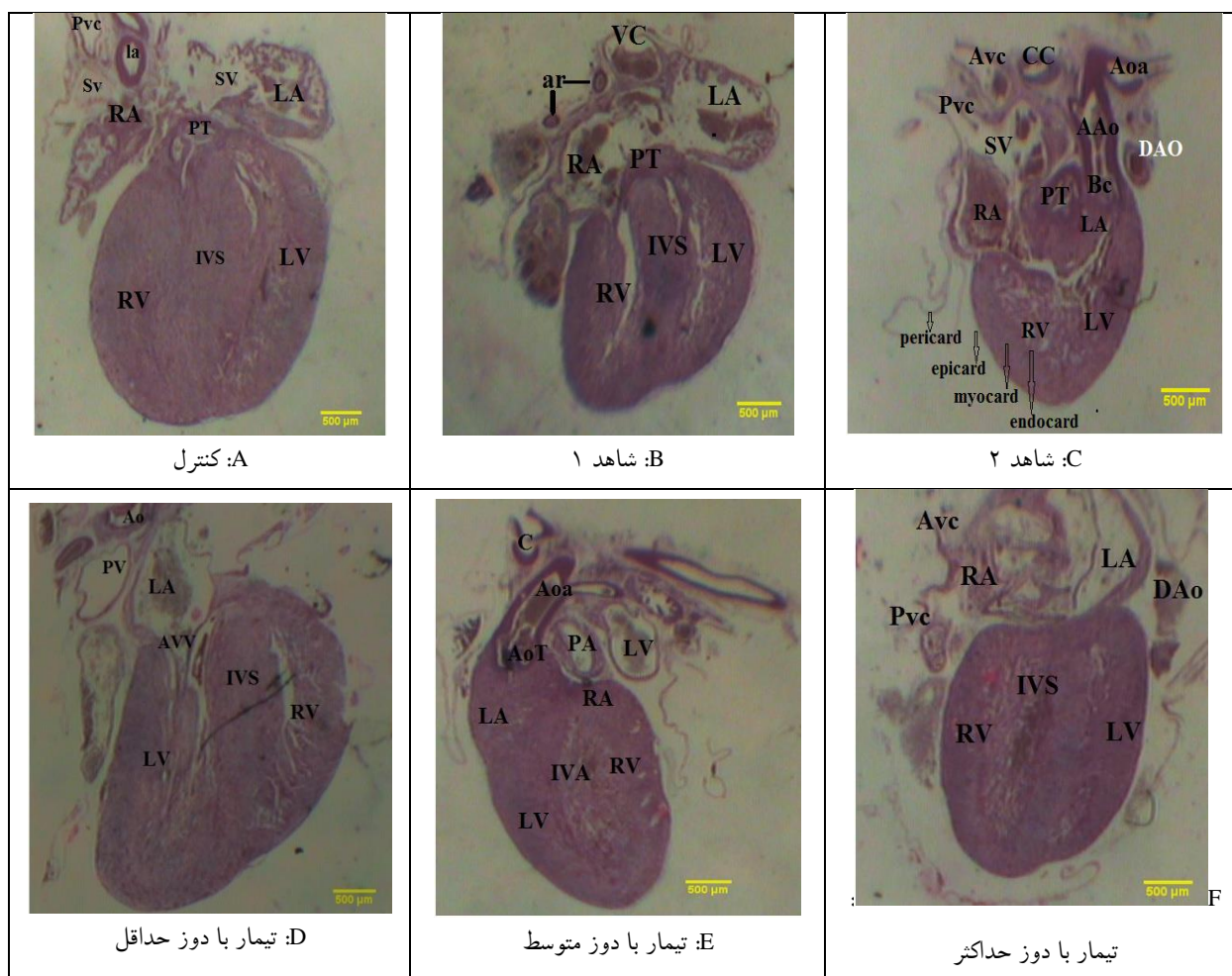
شکل ۲- مقایسه میانگین میزان قند خون در سرم موش مادر در گروه‌های مورد بررسی



شکل ۳- تراکم هسته‌های کاردیومیوسیت در بافت قلب جنین ۲۰ روزه (رنگ آمیزی H&E- بزرگنمایی ۴۰۰×)

حداکثر عصاره مشگک، کاهش تراکم مشهود است (شکل ۳) که با نتایج حاصل از شمارش این دسته از سلول‌ها (شکل ۱-F) کاملاً مطابقت دارد.

تراکم کاردیومیوسیت‌ها در گروه شاهد ۲ (دیابتی بدون بیمار) در مقایسه با گروه کنترل بیشتر است و در گروه‌های بیمار به‌ویژه گروه‌های مصرف‌کننده دوز متوسط و دوز



شکل ۴- بافت قلب جنین ۲۰ روزه

دهلیز چپ (LA)، دهلیز راست (RA)، سیتوم بین بطن‌ها (IVS)، بطن چپ (LV)، بطن راست (RV)، تنه آئورتی (AAO)، کاروتید (C)، کاروتید مشترک (CC)، کمان آئورتی (Aoa)، آئورت پستی (DAO)، آئورت بالا رونده (AAO)، سینوس سیاهرگی (SV)، سیاهرگ ششی (PV)، تنه ششی (PT)، اجوف زیرین (Pvc)، اجوف زیرین (Avc)

بحث

حاد نارسایی قلبی یا عارضه کاردیومیوپاتی دیابتی را در مادر و جنین موجب می‌شود (Lee et al., 2012; Gürke et al., 2015). با اینکه داروهای صنعتی کنونی تا حدودی در کاهش قند خون مؤثر بوده‌اند ولی هنوز دیابت یک معضل سلامتی عمومی است که منجر به کاهش کیفیت زندگی، مرگ و میر و هزینه‌های اقتصادی قابل توجه می‌گردد. نتایج حاصل از میکرومتری قلب جنین‌های مورد مطالعه حکایت از اثرهای دیابت بر وزن بدن، وزن قلب، طول و تراکم سلول‌های قلبی در همه گروه‌های مورد بررسی دارد

بارداری یک وضعیت متابولیک پیچیده است و شامل تغییرات قابل توجهی در محیط هورمونی است که با افزایش قابل توجه سطوح استروژن و پروژسترون (Nadal et al., 2009)، پرولاکتین (Wang et al., 2013)، کورتیزول (Joshua & Sherita, 2017)، هورمون رشد جفتی، لپتین، α -TNF و دیگر شاخص‌های استرس اکسیداتیو همراه است (Shin-Hye et al., 2017; Hami et al., 2013). دیابت بارداری اثرهای مخربی بر قلب داشته و در موارد

توجه‌تر از تغییرات بافتی قلب است (شکل ۴). نتیجه اندازه‌گیری ضخامت دیواره بطن چپ و راست (شکل ۱- C و D) و سپتوم بین دو بطن (شکل ۱- E) مشابه با اندازه وزن (شکل ۱- A) در گروه‌های مورد بررسی بود که اثر دیابت بر قلب و همچنین آثار بهبود عوارض آن در گروه‌های تیمار توسط مشگک را تأیید می‌کند. دیابت با افزایش ضخامت دیواره بطن‌ها، حجم حفره‌های قلب را برای ذخیره خون کاهش می‌دهد (Lee et al., 2012). با توجه به نقش حیاتی این حفره در پمپاژ و گردش خون سیستمیک در بدن، به اهمیت نقش گیاهان یا مواد خوراکی که بتوانند اثر نامطلوب دیابت را بر گردش خون کم کنند پی برده می‌شود. چنانچه در مطالعات Noorafshan و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان داده شد که دیابت مادر ضمن افزایش وزن قلب، حجم حفره‌های قلب و عروق جنین را کاهش می‌دهد. افزایش تعداد و توده سلولی کاردیومیوسیت‌ها (شکل ۱- F) نیز افزایش وزن قلب را به دنبال دارد. البته بهم‌ریختگی انسجام دیواره در اثر دیابت نیز قابل انتظار بود (شکل ۴- C) که بهبود آن همراه با کاهش ضخامت دیواره به‌ویژه در دوزهای بیشتر (شکل ۴- E و F) اثر مثبت این گیاه را نشان می‌دهد.

نتایج تحقیقات Kohpima و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان داد که دیابت موجب کاهش فشار سیستولی بطن چپ و نیز کاهش سرعت تغییرات فشار در هنگام سیستول و دیاستول می‌شود که با یافته‌های این تحقیق و افزایش معنی‌دار ضخامت دیواره بطن‌ها در گروه دیابتی (شکل ۱- C و D) مطابقت دارد. ضخامت دیواره‌ها و حتی ضخامت سپتوم بین بطن‌ها نیز عامل افزایش محیط قلب در گروه دیابتی است. به‌نحوی که بزرگ شدن قلب (افزایش محیط) عوارض سوء برای جنین به همراه دارد که حتی می‌تواند منجر به مرگ آن شود.

تغییرات میکرومتریک مشاهده شده در گروه دیابتی (شکل ۱- H و F)، مطابق با نتایج حاصل از تحقیقات Kamrani Moghaddam و همکاران (۲۰۱۴) و Mellor و همکاران (۲۰۱۳) بود. کاهش طول سلول‌ها بر خلاف

(شکل ۱). این نتایج مطابق با تحقیقات Noorafshan و همکاران (۲۰۱۳)، متأثر شدن رشد و نمو قلب جنین را در مادر دیابتی نشان می‌دهد. در این تحقیق، افزایش وزن بدن جنین مشاهده شد که قابل انتظار بود (شکل ۱- A). تحقیقات محققان نشان داده که نوزادان مادران دیابتی دارای وزنی بیش از مقدار طبیعی هستند (Abi Khalil et al., 2010). با توجه به اینکه دیابت بارداری یک بیماری متابولیک است و زمانی ایجاد می‌گردد که عملکرد پانکراس مختل شده است، بنابراین انتظار می‌رود که در نتیجه اختلال متابولیسم کربوهیدرات‌ها و گلوکز، روند گلیکولیز در کبد و توزیع چربی در بدن نیز مختل شده باشد که بدنبال آن چاقی جنین (ماکروزومی) پیش می‌آید (Abi Khalil et al., 2010). این وضعیت باعث سخت شدن زایمان و آسیب‌هایی به جنین هنگام زایمان از جمله دررفتگی شانه موقع زایمان، زجر تنفسی و حتی مرگ جنین می‌شود (Kamrani Moghaddam et al., 2014). عدم مشاهده این عوارض در جنین‌های این مطالعه، شاید به کوتاه بودن مدت تحقیق یا خفیف بودن عوارض مربوط باشد.

افزایش وزن قلب جنین گروه شاهد ۲ (دیابتی)، به تبعیت از افزایش وزن کل بدن، تحت تأثیر افزایش قند می‌باشد و در گروه‌های تیمار با مشگک به‌صورت وابسته به دوز مصرفی کاهش یافته است که اثر مثبت عصاره مشگک را نشان می‌دهد (شکل ۱- B). البته تأثیر مثبت عصاره مصرفی شاید به دلیل ترکیب‌های فورانونومارینی موجود در آن است (Mahboubi & Feizabadi, 2013; Hagi et al., 2004) که با اثر بر برخی آنزیم‌های روده و مهار کردن فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز از تجمع گلوکز در خون جلوگیری نموده و باعث کاهش قند خون می‌شود (Mottaghipisheh et al., 2014; Karakaya et al., 2018). اظهار نظر قطعی در این زمینه به تحقیقات اختصاصی‌تر نیاز دارد.

مشاهده تغییرات بافتی قلب جنین در موش‌های دیابتی بدون تیمار، گواه اثر دیابت بر رشد و نمو قلب در دوره جنینی است که توجه زیاد به این مسئله را طلب می‌کند. اثر مثبت عصاره مشگک در نتایج میکرومتریک (شکل ۱) قابل

اثر ضد دیابتی هستند (Hosseini *et al.*, 2014) و مصرف این گیاهان قادر به جلوگیری از نارسایی‌ها و عوارض سوء ناشی از دیابت بر تکوین اندام‌های جنینی می‌باشد (Hunt *et al.*, 2000). بنابراین تحقیقات بیشتر در رابطه با تفکیک ترکیب‌های موجود در عصاره و بررسی اثر آن بر متابولیسم قند در محیط‌های کشت (in vitro) و در بدن موجود زنده (in vivo) توصیه می‌شود تا بتوان برای معرفی این گیاه مفید قدمی برداشت.

به‌عنوان نتیجه‌گیری با استناد به نتایج حاصل از این تحقیق، عصاره آبی-الکلی مشگک (*D. anthifolia*) با کاهش گلوکز خون در موش‌های دیابتی مادر تغییرات تخریبی ناشی از دیابت را در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) جبران کرده و تا حدودی اثر محافظتی به‌صورت وابسته به دوز در مقابل آسیب‌های ناشی از دیابت بر رشد و تکوین قلب داشته است. بنابراین با ذکر این مطلب که تکوین قلب جنین متأثر از دیابت بارداری اختلال بافتی نشان می‌دهد، از این رو تحقیقات بیشتر را در رابطه با مصرف این گیاه به‌عنوان راهکار درمانی برای تنظیم هایپرگلاسمی پیشنهاد نموده تا بتوان آن را به‌عنوان یک مکمل غذایی در مدیریت دیابت به‌ویژه در دوران بارداری که محدودیت مصرف بعضی از داروهای ضد قند را دارند ارائه نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم برای پشتیبانی از این تحقیق، ابراز می‌دارند.

منابع مورد استفاده

- Abi Khalil, C., Travert, F., Fetita, S., Rouzet, F., Porcher, R., Riveline, J.P., Hadjadj, S., Larger, E., Roussel, R., Vexiau, P., Le Guludec, D., Gautier, J.F. and Marre, M., 2010. Fetal exposure to maternal type 1 diabetes is associated with renal dysfunction at adult age. *Diabetes*, 59(10): 2631-2636.
- American Diabetes Association, 2018. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 41: S13-S27.

پارامترهای دیگر مورد بررسی در گروه دیابتی، شاید به علت تکثیر زیاد آن باشد که با تأثیر ترکیب‌های موجود در عصاره مشگک در گروه‌های تیمار، بهبود تغییرات دیده می‌شود. بازگشت این تغییرات هر چند در سطح گروه کنترل نیست ولی تا حدودی اعمال اثر حفاظتی در مقابل آسیب‌های ناشی از دیابت است. از سویی از تأثیر دیابت القایی طی ۲۰ روز نمی‌توان چشم‌پوشی کرد.

وجود ترکیب‌هایی مانند آلفاتیک آلدئیدها، مونوترین‌ها مانند لیمونن، سیترونال، ترپینول، میرسن و همچنین کومارین‌هایی مانند پنگولین یا مونوترین‌های موجود در این گیاه که توسط محققان ایرانی گزارش شده است (Mahboubi & Feizabadi, 2013) از یک‌سو (Hajhashemi *et al.*, 2012) و اثر ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی برخی از این ترکیب‌ها از سوی دیگر (Falah *et al.*, 2006) می‌تواند عامل جبران ضخامت دیواره‌های قلب در گروه‌های تیمار با عصاره مذکور باشد.

در رابطه با تراکم سلول‌ها، نتایج حاصل بر خلاف تحقیقات Vinceti و همکاران (۲۰۱۵) و Lee و همکاران (۲۰۱۲) بود که التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت را عاملی برای کاهش تعداد کاردیومیوسیت و هیپرتروفی در حجم حفره‌های قلب موش بالغ دیابتی اعلام کردند بودند، به‌طوری که شاید زمان اثر دیابت در این تحقیق (دوره جنینی) عامل تفاوت نتیجه باشد. از سویی افزایش تعداد کاردیومیوسیت با افزایش وزن قلب کاملاً همخوانی دارد، همچنین حجم حفره‌های بطن (شکل ۵- C) نیز با افزایش محیط قلب در گروه دیابتی بدون تیمار در مقایسه با گروه کنترل همخوانی داشت. به‌نحوی که نزدیک شدن این تغییرات به وضعیت بافت قلب در گروه‌های تیمار (شکل‌های ۱- H، ۴- D، ۴- E و ۴- F) به‌ویژه در دوز حداکثر به گروه کنترل در مقایسه با گروه دیابتی بدون تیمار، توانایی عصاره مشگک را در بهبود بافتی در اثر دیابت نشان می‌دهد. مطابقت این نتایج با کاهش گلوکز در خون مادر (شکل ۲) این نتیجه را تأیید می‌کند.

تحقیقات زیادی نشان داده است که برخی گیاهان دارای

- diabetes mellitus. *Journal of Clinical Excellence*, 2(2): 64-89.
- Hosseini, E. and Karimzadeh, K., 2012. Anti-diabetic effects of hydroalcoholic *Juglans regia* male flower extract on blood glucose level and on liver enzymes activity in intact and diabetogenized adult male rat. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 19(2): 165-172.
 - Hunt, L.M., Arar, N.H. and Akana, L.L., 2000. Herbs, prayer, and insulin: Use of medical and alternative diabetic patients. *The Journal of family practice*, 49: 216-223.
 - Jasmine, F., Plows, J., Stanley, L., Philip, N., Baker, C., Reynolds, M. and Vickers M.H., 2018. The pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Science*, 19: 2-21.
 - Joshua, J.J. and Sherita, H.G., 2017. Cortisol dysregulation: the bidirectional link between stress, depression, and type 2 diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1391(1): 20-34.
 - Kamrani Moghaddam, L., Sadooghi, M., Minaii Zangbi, B., Farmani, M., Ramezani, S. and Najd, F., 2014. The effect of *Hordeum vulgare* L. on the histopathological changes of embryonic heart in diabetic rats during pregnancy. *Razi Journal of Medical Sciences*, 22(133): 80-88.
 - Karakaya, S., Gözcü, S., Güvenalp, Z., Özbek, H., Yuca, H. and Dursunoğlu, B., 2018. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of the dichloromethane extracts and constituents of *Ferulago bracteata* roots. *Pharmaceutical Biology*, 56(1): 18-24.
 - Kohpima, A., Mirkhani, H., nekoian, A. and Sent, D., 2009. Determining the effect of hesperidine on cardiac dysfunction due to type 1 diabetes in rats. *Bringing Knowledge*, 14(1): 25-35.
 - Lee, Y., Hong, Y., Lee, S.R., Chang, K.T. and Hong, Y., 2012. Autophagy contributes to retardation of cardiac growth in diabetic rats. *Laboratory Animal Research*, 28(2): 99-107.
 - Mahboubi, M. and Feizabadi, M., 2013. Antimicrobial activity of *Ducrosia anethifolia* essential oil and main component, Decanal against Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(5): 574-579.
 - Mellor, K.M., Bell, J.R., Ritchie, R.H. and Delbridge, L.M., 2013. Myocardial insulin resistance, metabolic stress and autophagy in diabetes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40(1): 56-61.
 - Mottaghipisheh, J., Maghsoudlou, M. and Valizadeh, J., 2014. Antioxidant activity and chemical composition of the essential oil of *Ducrosia*
 - Amiri, A. and Nasiri, A., 2006. The role of vitamin E in reducing the incidence of developmental disorder in mice induced diabetic rats. *Journal of Medical Sciences Guilan*, 59: 7-10.
 - Ciftci, O., Ozdemir, I., Tanyildizi, S., Yildiz, S. and Oguzturk, H., 2011. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicology and Industrial Health*, 27(5): 447-453.
 - Darzi Ramandi, A., Nazeri, V. and Naderi, R., 2011. Investigation of germination of *Ducrosia anethifolia* under the influence of cold and hormonal treatments. National Conference of Medicinal Plants, Mazandaran University, Sari, Mazandaran, 1 March.
 - Falah Hosseini, H., Fakhrzadeh, H., Larijani, A. and Shikh Samani, A.H., 2006. Review of anti-diabetic medicinal plant used in traditional medicine. *Journal of Medicinal Plants*, 5: 85-60.
 - Foroughi, A., Pournaghi, P., Najafi, F., Zangeneh, A., Zangeneh, M.M. and Moradi, R., 2016. Evaluation of antibacterial activity and phytochemical screening of *Pimpinella anisem's* essential oil. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 8(11): 1886-1890.
 - Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R. and Pakkenberg, B., 1988. The New stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. (*Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*) APMIS, 96(10): 857-881.
 - Gürke, J., Hirche, F., Thieme, R., Haucke, E., Schindler, M. and Stangl, G.I., 2015. Maternal Diabetes Leads to Adaptation in Embryonic Amino Acid Metabolism during Early Pregnancy. *PLoS ONE*, 10(5): e0127465.
 - Hagi, G., Safaei, A. and Safari, J., 2004. Extraction and determination of the main components of the essential oil of *Ducrosia anethifolia* by GC and GC/MS. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 3(2): 90-91.
 - Hajhashemi, V., Rabbani, M., Ghanadi, A. and Davari, E., 2012. Evaluation of antianxiety and sedative effects of essential oil of *Ducrosia anethifolia* in mice. *Clinics*, 65: 1037-1042.
 - Hami, J., Sadr-Nabavi, A., Sankian, M., Balali-Mood, M. and Haghiri, H., 2013. The effects of maternal diabetes on expression of insulin-like growth factor-1 and insulin receptors in male developing rat hippocampus. *Brain Structure and Function*, 218(1): 73-84.
 - Hosseini, S.E., Tavakoli, F. and Mohammad Karami, M., 2014. Medicinal plants in the treatment of

- anethifolia* (DC.) Boiss. essential oil made by sonication and filtration methods. *Journal of Medicinal Plants*, 19(74): 229-238.
- Shalaby, N.M., Abd-Allah, H., Aly, H.F. and Albalawy, M.A., 2014. Preliminary in vitro and in vivo evaluation of antidiabetic activity of *Ducrosia anethifolia* Boiss. and its linear furanocoumarins. *BioMed Research International*, 5: 480-545.
 - Shin-Hye, K. and Mi-Jung, P., 2017. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 22(3): 145-152.
 - Shokri, H., Hekmat, p. and Fakhar, E. 2012. Effect of *Durosia anethifolia* (Barilax) on anxiety after myocardial infarction. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 7: 28-34.
 - Stavri, M., Mathew, K.T., Bucar, F. and Gibbons, S., 2003. Pangelin. An antimycobacterial coumarin from *Ducrosia anethifolia*. *Planta Medica*, 69: 956-959.
 - Vinceti, M., Malagoli, C., Rothman, K.J., Rodolfi, R., Astolfi, G. and Calzolari, E., 2015. Risk of birth defects associated with maternal pregestational diabetes. *European Journal of Epidemiology*, 29(6): 411-418.
 - Wang, T., Lu, J., Xu, X., Li, M., Sun, J., Zhang, J. and Xu, B., 2013. Circulating prolactin associates with diabetes and impaired glucose regulation: a population-based study. *Diabetes Care*, 36(7): 1974-1980.
 - *anethifolia* (DC.) Boiss. from Neyriz. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2: 215-218.
 - Mottaghipisheh, J., Nové, M., Spengler, G., Kúsz, N. and Hohmann, J., 2018. Antiproliferative and cytotoxic activities of furocoumarins of *Ducrosia anethifolia*. *Pharmaceutical Biology*, 56(1): 658-664.
 - Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Ropero, A.B. and Quesada, I., 2009. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *Journal of Physiology*, 587(21): 5031-5037.
 - Noda, M., Origasa, H., Noto, H., Yabe, D. and Fujita, Y., 2010. A review of maternal and fetal growth factors in diabetic pregnancy. *Current Diabetes Reviews*, 6(2): 116-125.
 - Noorafshan, A., Khazraei, H., Mirkhani, H. and Karbalay-Doust, S., 2013. Stereological study of the diabetic heart of male rats. *Laboratory Animal Research*, 29(1): 12-18.
 - Obidi, L., 2009. Cytogenetic study of the plant. Master's degree in Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, Iran.
 - Porta, M., Curletto, G., Cipullo, D., Longrais, R., Trento, M., Passera, P., Trento, M., Passera, P., Viola, A.T., Miceli, S.D., Cenci, A., Dalmaso, P. and Cavallo, F., 2014. Estimating the delay between onset and diagnosis of type 2 diabetes from the time course of retinopathy prevalence. *Diabetes Care*, 37(6): 1668-1674.
 - Salari, S. and Shamsodini, M., 2020. The production of nanoliposomal system containing *Ducrosia*

Effects of aqueous-alcoholic extract of *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss. leaves on fetal heart tissue in diabetic rats

M. Karami¹ and F. Ghasemi^{2*}

1- M.Sc., Graduated, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

2*- Corresponding author, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

E-mail: Ghassemi.fr@gmail.com

Received: May 2020

Revised: November 2020

Accepted: November 2020

Abstract

This study aimed to investigate the effects of aqueous-alcoholic extract of *Ducrosia anethifolia* (DC.) Boiss. leaves on the fetal heart tissue changes in the diabetic rats. Forty-eight female rats weighing 200-220 g were fertilized with eight male rats weighing 230-250 g. After ensuring the pregnancy, the females became diabetic by intraperitoneal injection of streptozotocin (80 mg kg⁻¹ body weight) on the first day of pregnancy, and were randomly grouped. Groups included Control (healthy rats without treatment), Sham 1 (healthy rats receiving 1 ml *D. anethifolia* extract), Sham 2 (diabetic rats without treatment), and three groups of treatments which respectively received 1 ml *D. anethifolia* extract at the doses of 250, 500, and 1000 kg kg⁻¹ body weight of the diabetic rats from 6th to 20th day of the pregnancy by gavage. On the 20th day of pregnancy, after anesthetizing the rats and taking 2 ml of blood from their hearts, the fetuses were removed from their uterus. The fetal hearts were isolated and fixed in the 5% solution of formalin. After the tissue processing, the five-micron sections were prepared by the stereological method and stained with hematoxylin and eosin. The heart circumference and its wall thickness were measured by the image analysis software, and the number of heart cells was counted by the Grids-sterio lite software. The data were analyzed by the ANOVA and the means were compared by the Tukey test ($P \leq 0.05$). The findings showed an increase in the blood glucose, density and length of cardiocytes, and heart circumference in all the diabetic groups compared to the control, which were significantly reduced in the diabetic rats treated with *D. anethifolia* extract compared to the diabetic group without treatment. According to the results, the aqueous-alcoholic extract of *D. anethifolia* leaves could slightly compensate the destructive changes caused by diabetes in the fetal cardiovascular tissue by reducing the blood glucose in the diabetic rats.

Keywords: Blood glucose, cardiocyte, Meshgak extract (*Ducrosia anethifolia* (Dc.) Boiss.), micrometry.