Applied Biology, Volume 10, Issue 37, 2020

Study effect of methanolic extract of *Peganum Harmala* and Harmine on Kidney tissue damage of diabetes mellitus in male Wistar rats[1]

Forough Kajbaf | Phd. Student, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. forough_kajbaf@yahoo.com
Shahrbanoo Oryan | Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. sh_oryan@khu.ac.ir
Ramesh Ahmadi | Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran **(Corresponding Author).** Ramahmd@yahoo.com
Akram Eidi | Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. eidi@srbiau.ac.ir

Abstract

Introduction: The dangerous side effects of diabetes are diabetic nephropathy, which has a relatively high prevalence in diabetic patients and causes renal failure. Investigating the process of destruction and the mechanisms that prevent it, in order to reduce the tissue damage, especially with the treatment of plants, can be a significant issue.

Material and methods: In this research, Espand with scientific name of Peganum harmala, a plant of the Zygophyllaceae family and its effective substance called harmine in diabetes-induced renal injury, were studied on 80 male Wistar rats in experimental and diabetic groups. Rats were treated with methanolic extract of seeds and leaves of Peganum Harmala and Harmine. After tissue passage and fixation, Microscopic slides were prepared and studied. In tissue studies, four factors of epithelial changes, tubular destruction, leukocyte inflammation and capillary obstruction were detected in the kidneys.

Results: The diabetic rat group received harmine and the diabetic rats receiving the extract of the seed were less damaged, while in the diabetic rats recieveing the leaf extract these lesions was higher and it was interesting to note that there was no difference in the experimental groups with the positive control group.

Conclusion: According to the tissue results in our study, seed extract and harmine have the ability to prevent tissue damage caused by diabetes, which can be attributed to the harmine alkaloid in the seed.

Keywords: Type 2 diabetes, Methanolic extract of Peganum Harmala, Harmine, Kidney.

1. **Received:** 2019/06/11 ; **Accepted:** 2019/07/21

**Copyright © the authors

بیولوژی کاربردی، دوره ۱۰، شماره ۳۷، بهار ۱۳۹۹

بررسی اثر عصاره متانولی پگانوم هارمالا و هارمین بر آسیب بافتی ناشی از دیابت در کلیه رت‌های نر نژاد ویستار[۱]

فروغ کجباف | دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران. forough_kajbaf@yahoo.com
شهربانو عریان | استاد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران. sh_oryan@khu.ac.ir
رامش احمدی | استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران (**نویسنده مسئول**). Ramahmd@yahoo.com
اکرم عیدی | استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران. eidi@srbiau.ac.ir

چکیده

هدف: از عوارض خطرناک دیابت، نفروپاتی دیابتی است که شیوع نسبتاً بالایی در بیماران دیابتی داشته و باعث نارسایی کلیه می شود. بررسی روند تخریب و مکانیسم‌های جلوگیری‌کننده از آن در جهت کاهش آسیب‌های بافتی مخصوصا با تیمار توسط گیاهان می تواند موضوع قابل تاملی باشد .

مواد و روش‌ها: در این تحقیق اسپند با *نام علمی Peganum harmala*، گیاهی از خانواده Zygophyllaceae و ماده موثره آن به نام هارمین در آسیب کلیوی ناشی از دیابت، بر روی ۸۰ راس رت نر نژاد ویستار در گروه‌های تجربی و دیابتی تحت تیمار با عصاره متانولی دانه و برگ پگانوم هارمالا و نیز هارمین صورت گرفت. پس از انجام مراحل فیکس و پاساژ بافتی، لام‌های میکروسکوپی تهیه شده و مطالعه گردید.

یافته‌ها: در بررسی‌های بافتی چهار فاکتور تغییرات اپی تلیالی، تخریب توبولی، التهاب لوکوسیتی و گرفتگی مویرگی در کلیه بررسی و مشخص شد، گروه رت دیابتی دریافت‌کننده هارمین و گروه رت دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه دچار تخریب و آسیب‌دیدگی کمتری شده است در حالی که در گروه رت دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ این آسیب‌ها بالاتر بود و جالب توجه بود که درگروه‌های تجربی هیچ اختلافی با گروه کنترل مثبت مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج بافتی در تحقیق ما عصاره دانه و هارمین این توانایی را دارد که جلوی آسیب بافتی ناشی از دیابت را بگیرد که این را می‌توان به آلکالوئید هارمین موجود در دانه نسبت داد.

کلیدواژه‌ها: دیابت، عصاره متانولی پگانوم هارمالا، هارمین، آسیب بافتی، کلیه، رت‌های نر نژاد ویستار.

---

۱. **تاریخ دریافت:** ۱۳۹۸/۰۳/۲۱ ؛ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۴/۳۰

۱. مقدمه

دیابت نوع دو به صورت ناهنجاری‌های پاتولوژیك اختلال در ترشح انسولین، مقاومت محیطی به انسولین و تولید بیش از حد گلوکز کبدی مشخص می‌شود (۱). یکی از اختلالات مهم دیابت، دیابت کلیوی است. در تمام مطالعات نشان داده شده که تجمع ماکروفاژها در کلیه، با گسترش دیابت و آسیب کلیوی همراه است (۲, ۳). نارسایی مزمن کلیه در اثر دیابت مهم‌ترین علت نارسایی کلیوی مرحله انتهایی[1] در سراسر جهان و مهم‌ترین علت مرگ زودرس بیماران دیابتی است (۴, ۵). نتایج مطالعات حاکی از این است که مکانیسم‌های نفروپاتی دیابتی خود عامل تغییرات گلیکوزیله شدن غیرآنزیمی پروتئین‌ها، فعال شدن پروتئین کیناز c و افزایش فعالیت ردوکتاز آلدوز[2] می‌باشد. این حوادث باعث افزایش تولید ترومبوکسان، فاکتورهای رشد، فیبرونکتین و کلاژن و افزایش رادیکال‌های آزاد می‌شود که می‌تواند توسعه و پیشرفت عوارض ناشی از دیابت را به دنبال داشته باشد (۶). در مراحل ابتدایی بیماری دیابت کلیوی، تغییرات همودینامیک همچون افزایش فیلتراسیون گلومرولی[3] و جریان خون کلیوی رخ می‌دهد. با پیشرفت بیماری، هیپرگلایسمی مزمن، باعث تغییرات آسیب‌شناختی از جمله افزایش قطر غشای پایه گلومرولی و توبولی، گسترش ماتریکس سلول‌های مزانشیال و گلومرولواسکلروز می‌گردد (۷). این تغییرات با اختلال در عملکرد کلیه، منجر به افزایش اوره و کراتینین خون می‌شوند. در نهایت، سد فیلتراسیون آسیب دیده و پروتئین اوری صورت می‌گیرد که از علائم اصلی بیماری نفروپاتی دیابتی است (۸). در مراحل پیشرفته و یا مراحل انتهایی بیماری، میزان فیلتراسیون گلومرولی کاهش یافته و دفع پروتئین با شدت فراوان ادامه می‌یابد (۹, ۱۰).

طبق بررسی‌های اخیر محققین، هیپرگلیسمی منجر به کاهش بیان آنزیم‌های دفاع آنتی اکسیدانی می‌شود (۱۱). با توجه به اینکه برخی گونه‌های گیاهی دارای خواص درمانی برای دیابت هستند (۱۲)، بررسی اثربخشی آنها در کنترل میزان آپوپتوز ناشی از دیابت مهم بوده و می‌طلبد که تحقیقات دامنه‌داری در این زمینه انجام شود. یکی از این گیاهان، اسپند با نام

1. ESRD
2. Reductase Aldose
3. GFR

علمی.*Peganum harmala* L گیاهی پایا و بدون کرک از تیره Zygophyllaceae است (۱۳) که در ایران، در مناطقی که گیاه به صورت بومی رشد می‌کند، دارای سابقه مصرف طولانی است. ترکیبات فعال پگانوم هارمالا عمدتاً شامل بتا – کاربولین‌ها[1] نظیر هارمالین[2] و هارمین[3] است که به تنهایی بالغ بر ۶۰% آلکالوئیدهای موجود در دانه را تشکیل می‌دهند. مشتقات کینازولینی[4] همچون وسی سین[5] و وسی سینون[6] دسته دیگری از آلکالوئیدهای یافت شده در پگانوم هارمالا هستند (۱۴). اثرات دارویی ذکر شده برای این گیاه متعدد است (۱۵). تحقیقات مختلف فعالیت سمیت سلولی را در سلول‌های سرطانی از طریق پگانوم هارمالا در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی گزارش داده‌اند. اثرات ضد تکثیری بر خط سلولی لوسمی، عملکرد مهاری بر روی متاستاز سلول‌های ملانوما، شامل آپوپتوز در سلول‌های ملانوما، مهار آنژیوزنز توموری و اتصال به RNA سلول‌های توموری را به نمایش گذاشت. فعالیت ضد التهابی پگانوم هارمالا و آلکالوئیدهای آن در مطالعات مختلف اثبات شده است. پگانوم هارمالا اثرات ضد التهابی و تعدیل ایمنی را از طریق سرکوب واسطه‌گرهای پیش التهابی مانند پروستاگلاندینE۲، نکروز تومور فاکتور آلفا و فاکتور کاپا هسته‌ای B، به نمایش می‌گذارد (۱۶).

مسیر متابولیکی که منجر به تشکیل تاکاربولین‌ها می‌شود، از طریق فشرده‌سازی Pictet-Spengler بین یک ایندول آمین (به عنوان مثال تریپتیامین) و آلدئیدها (به عنوان مثال استالدئید) می‌باشد (۱۷). بتا-کاربولین‌ها طیف گسترده‌ای از عمل، به ویژه در عضلات، سیستم قلبی- عروقی و سیستم عصبی مرکزی[7]، از جمله مهار منوآمین اکسیداز (۱۸)، اتصال به بنزودیازپین، سروتونین، دوپامین و گیرنده‌های ایمیدازولین را انجام می‌دهند (۱۹). در رابطه با خواص آنتی اکسیدانی بتاکاربولین‌ها بعضی گزارش‌ها نشان می‌دهد که هارمان، هارمالین و

1. β-carbolines
2. Harmaline
3. Harmine
4. Quinazolines
5. Vasicinone
6. Vasicine
7. CNS

هارمالول فعالیت آنتی اکسیدانی را با مهار پراکسیداسیون لیپید در سلول‌های کبدی میکروزومال نشان می‌دهند (۲۰). فعالیت آنتی اکسیدانی پگانوم هارمالا به علت حضور ترکیباتی چون اسید اسکوربیک، توکوفرول، سیستئین، گلوتاتیون و ترکیبات آروماتیک پلی هیدرکسی می‌باشد (۲۱). علاوه بر این، اهمیت بیولوژیکی بتاکاربولین‌ها به اثر محافظت نورونی آنها نیز نسبت داده می‌شود. Maher و Davis (۲۲) نشان دادند که آلکالوئیدهای بتاکاربولین، نورون‌ها را در مقابل سمیت دوپامین و گلوتامات محافظت می‌کند. همچنین مطالعات دیگر نشان می‌دهد که این آلکالوئیدها تأثیر محافظتی بر آسیب عصبی اکسیداتیو را به وسیله فعالیت ذره‌خواری دارند (۲۳). تحقیقات دیگر حاکی از آن است که اثر ضد دیابتی دانه‌های پگانوم هارمالا به علت آلکالوئیدهای آن به ویژه هارمین است (۲۴).

با توجه به در نظر گرفتن تاثیر هایپرگلایسمی بر روند آسیب سلول‌های نسوج مختلف، یکی از اهداف تحقیق حاضر بررسی اثرات آنتی اکسیدانی هارمین و مقایسه آسیب بافتی کلیه ناشی از دیابت در رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو است که توسط عصاره الکلی برگ و دانه پگانوم هارمالا و نیز هارمین تیمار شده‌اند (۲۵, ۲۶).

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. حیوانات آزمایشگاهی

تعداد ۶۴ سرموش رت نر ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرمی از انستیتو پاستور تهران تهیه و به اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران منتقل شدند. پس از یک هفته قرار گرفتن در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، دسترسی به آب و غذای استاندارد) به طور تصادفی در ۱۰ گروه ۸ تایی قرار گرفتند. این پروتکل کار با حیوانات در جلسه کمیته سازمانی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران با شماره IR.IAU.SRB.REC.1396.37 مورد ارزیابی و به تصویب این کمیته رسید.

- **گروه‌بندی حیوانات**

۱. گروه دیابتی: (D)

۲. گروه کنترل: (C)

۳. گروه کنترل + هارمین: (H)

۴. گروه کنترل + عصاره دانه: (S)

۵. گروه کنترل + عصاره برگ: (L)

۶. گروه دیابتی + هارمین: (DH)

۷. گروه دیابتی + عصاره دانه: (DS)

۸. گروه دیابتی + عصاره برگ: (DL)

۲-۲. مراحل تهیه عصاره

گیاه پگانوم هارمالا از منطقه ۵ کیلومتری شهر زاهدان در اواخر فصل بهار جمع آوری و در باغ ملی گیاهشناسی ایران با شماره ۱۰۷۲۰۸ : TARI شناسایی شد. سپس گیاه به طور کامل در دمای محیط خشک گردید و برگ و دانه آن جدا شد. در مرحله بعد نمونه گیاه خرد شده به مقدار مورد نظر درون انگشتانه ریخته و در قسمت میانی سوکسوله قرار گرفت. سپس مقدار ۵۰۰ میلی لیتر حلال متانول درون بالن ریخته و یک عدد مگنت درون بالن قرار گرفت تا از قل زدن حلال جلوگیری شود. عصاره‌گیری به مدت ۳ الی ۴ ساعت ادامه یافت و در انتها عصاره بدست آمده در بالن جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شد.

۲-۳. دیابتی کردن حیوان و گاواژ داروها

دوز ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت درون صفاقی(IP) به رت‌ها تجویز گردید. پس از گذشت ۲ الی ۳ روز رت‌هایی که سطح پلاسمایی قند خون آنها در وضعیت ناشتا، بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم/ دسی لیتر بود و دچار پرنوشی و پر ادراری انتخاب و ده روز بعد پس از چک کردن سطوح پلاسمایی گلوکز خون توسط دستگاه گلوکومتر وارد آزمایش شدند. با توجه به مطالعات قبلی رت‌ها دوز ۶/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم هارمین و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره دانه و برگ اسپند را به مدت ۴ هفته متوالی به صورت گاواژ دریافت کردند. پس از اتمام دوره تیمار، رت‌ها با اتر بیهوش و جهت بررسی‌های بافت‌شناسی نمونه‌گیری از بافت کلیه انجام شد.

۲-٤. ارزیابی هیستوپاتولوژیک

قسمتی از بافت کلیه پس از خارج‌سازی در محلول بافر فرمالین ۱۰% پایدار شد. بعد از گذراندن مراحل بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطعی به قطر ۵ میکرون تهیه گردید. سپس

رنگ‌آمیزی صورت گرفت. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین[1] شامل شناورسازی نمونه در دو ظرف گزیلول (هر یك ۱۰ دقیقه)، الکل ۹۶% (۵ دقیقه)، الکل ۱۰۰% (۵ دقیقه) و هماتوکسیلین (۱۰ دقیقه)، یك بار وارد کردن در ظرف اسید الکل و بعد کربنات لیتیم، سه مرحله شستشو با آب، ائوزین (۳ دقیقه)، وارد کردن در ظروف الکل ۹۹، ۹۶ و ۱۰۰% و در نهایت شفاف‌سازی در دو ظرف گزیلول بود. اسلاید آماده شده توسط کارشناس بافتی مورد مطالعه قرار گرفت.

۲-۵. تجزیه و تحلیل آماری

اسلایدهای آماده شده توسط میکروسکوپ نوری مدل (N180M) بررسی و داده‌ها توسط نرم‌افزار Imagej جمع‌آوری و در نهایت توسط نرم‌افزار spss20 و روش آماری One way Anova، Tukey تحلیل شد و نمودارها در نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم گردیدند.

۳. یافته‌ها

شکل ۱: هیستوگرام‌های بافتی و بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی بافت کلیه رت‌های گروه‌های دیابتی و کنترل تحت تیمار با داروها مقایسه گردید.

در این شکل مقایسه بافتی عروق کلیوی، گلومرول‌ها و توبول‌ها در رت‌های دیابتی و سالم بررسی شد.

در سمت چپ به ترتیب از بالا به پایین شامل گروه رت‌های کنترل، رت‌های دریافت‌کننده عصاره برگ، رت‌های دریافت‌کننده عصاره دانه و رت‌های دریافت‌کننده هارمین می‌باشند.

در سمت راست به ترتیب از بالا به پایین گروه رت‌های دیابتی، رت‌های دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ، رت‌های دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه و رت‌های دیابتی دریافت‌کننده هارمین هستند.

نتایج در گروه رت‌های کنترل نشان داد که کپسول بومن با سلول‌های سنگفرشی کاملا مشخص و شبکه گلومرولی درون آن با رگ‌های آوران و وابران دیده می‌شود. در بخش مرکزی لوله‌های جمع‌کننده با سلول‌های مکعبی منظم قابل رویت بوده و قوس هنله در لابه‌لای آن با سلول‌های نازک‌تر دیده می‌شود.

---

1. H&E

در گروه رت‌های دریافت‌کننده عصاره برگ در بخش قشری که به شکل دانه‌دار است، کپسول بومن وجود دارد، که در بین آنها عروق خونی شبکه گلومرولی همراه با سلول‌های سنگفرشی یک لایه قابل مشاهده است.

نتایج همچنین در گروه رت‌های دریافت‌کننده عصاره دانه نشان داد که شبکه گلومرولی و کپسول بومن طبیعی، لوله‌های جمع‌کننده حالت نرمال، به جز چند مورد که تراوش خون در آنها دیده شده، در قسمت‌های محدودی نیز لوله پیچیده نزدیک، انسجام بافتی خود را از دست داده است.

همچنین در گروه رت‌های دریافت‌کننده هارمین بخش قشری تراوش در بین لوله‌ها دیده می‌شود، در بخش مرکزی، لوله‌های جمع‌کننده و قوس هنله انسجام بافتی ندارد.

نتایج در گروه رت‌های دیابتی نشان داد که در بخش قشری لوله‌های جمع‌کننده تا حدودی انسجام ندارند، شبکه گلومرول در برخی موارد کوچک است، در بخش مرکزی بعضی سلول‌ها دژنره گردیده و فضای بومن[1] زیاد شده است. گلومرول کوچک است. ارتشاح خون به درون لوله‌ها دیده می‌شود.

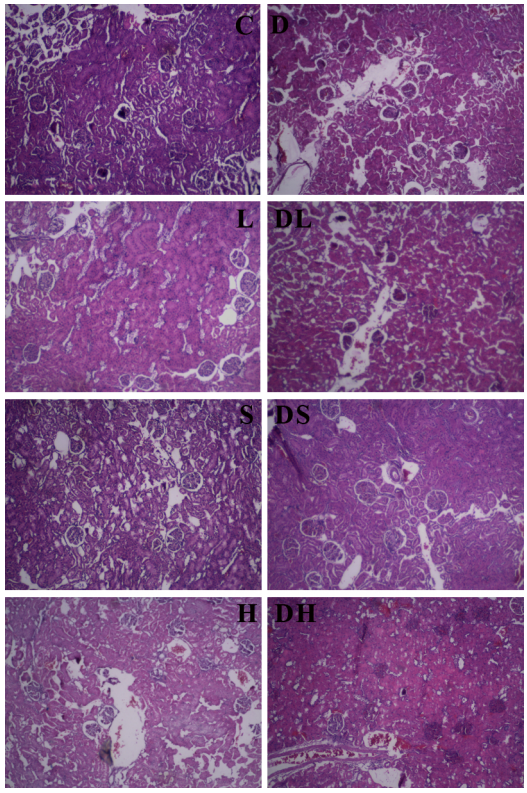
نتایج در گروه رت‌های دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ نشان داد که تمامی بخش‌های قشری و مرکزی، گلومرول‌ها، انسجام بافتی، لوله‌های جمع‌کننده دور و نزدیک به طور واضح قابل مشاهده و حالت ترمیمی دارند.

نتایج در گروه رت‌های دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه نشان داد که تا حدودی سالم به نظر می‌رسد و تخریب بافتی در آن کاهش داشته و بازسازی در بخش‌هایی مثل بومن و لوله‌ها در بخش مرکزی دیده می‌شود.

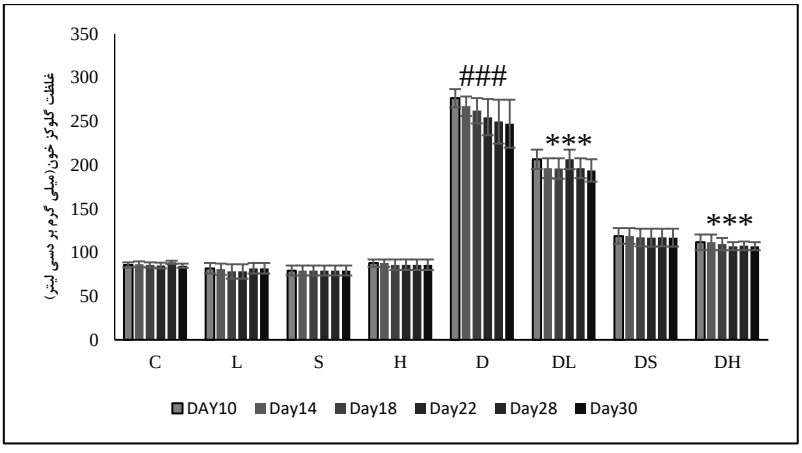
نتایج در گروه رت‌های دیابتی دریافت‌کننده هارمین نشان داد که کپسول بومن و سلول‌های سنگفرشی به همراه شبکه گلومرولی قابل مشاهده است، لوله‌های پیچیده دور و نزدیک سالم، ولی در بعضی نقاط پراکندگی بافتی دیده می‌شود. در بخش مرکزی، لوله‌های جمع‌کننده در برش‌های عرضی با سلول‌های مکعبی دیده می‌شود.

---

1. Bowman space



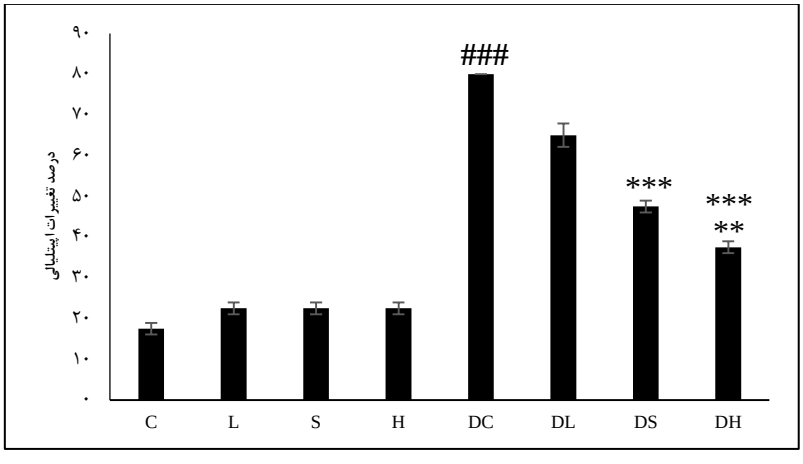
شکل ۱- بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی بافت کلیه (بزرگنمایی – ٤٠)



نمودار ۱- تغییرات سطح گلوکز خون بین گروه‌های کنترل و دیابتی(طی یک ماه)

(نمودارها نشان‌دهنده Mean±SE می‌باشند (N=8). ***، بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه دیابتی کنترل می‌باشد. ### بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه دیابتی کنترل است).

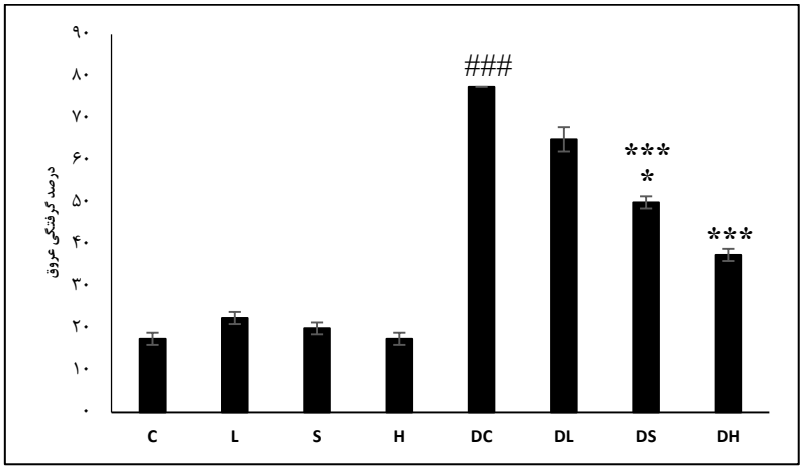
نمودار ۱ نشان‌دهنده آن است که افزایش معنی‌داری در گلوکز گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل وجود دارد. همچنین سطح گلوکز خون ناشی از دیابت در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ، دانه و هارمین کاهش یافته است. تغییر معناداری بین گروه‌های کنترل سالم مشاهده نشد.



نمودار۲- تغییرات اپیتلیالی بین گروه‌های کنترل و دیابتی

(نمودارها نشان‌دهنده Mean±SE می‌باشند (N=8) . *** بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه دیابتی کنترل است. ** بیان‌گر سطح معنی‌داری p<۰/۰۱ با گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه می‌باشد. ### بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه کنترل سالم است. تغییر معناداری بین گروه‌های کنترل سالم مشاهده نشد.)

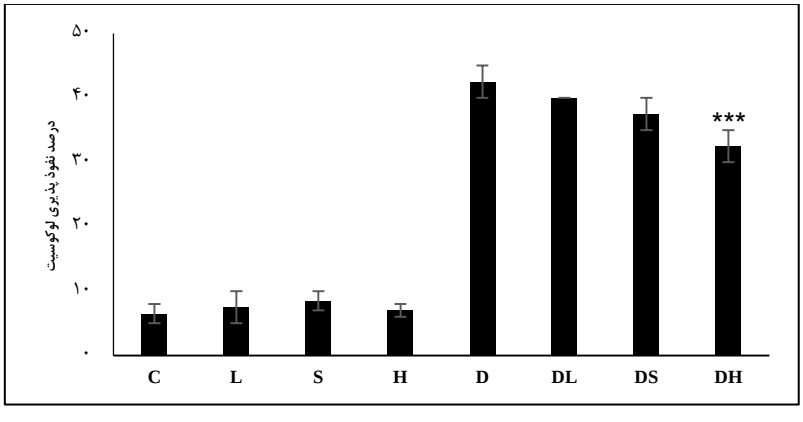
نمودار ۲، نشان می‌دهد که تخریب بافتی ناشی از دیابت در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه و هارمین وجود ندارد. همچین کاهش معنی‌داری در تغییرات اپیتلیالی در گروه دیابتی دریافت‌کننده هارمین نسبت به گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه مشاهده گردید. تغییر معناداری بین گروه‌های کنترل سالم مشاهده نشد.



نمودار۳ - نمودار گرفتگی عروق بین گروه‌های کنترل و دیابتی

(نمودارها نشان‌دهنده Mean±SE می‌باشند (N=8). *** بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه دیابتی است. * بیانگر سطح معنی‌داری p <۰/۰۵ با گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ می‌باشد. ### بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه کنترل سالم است.)

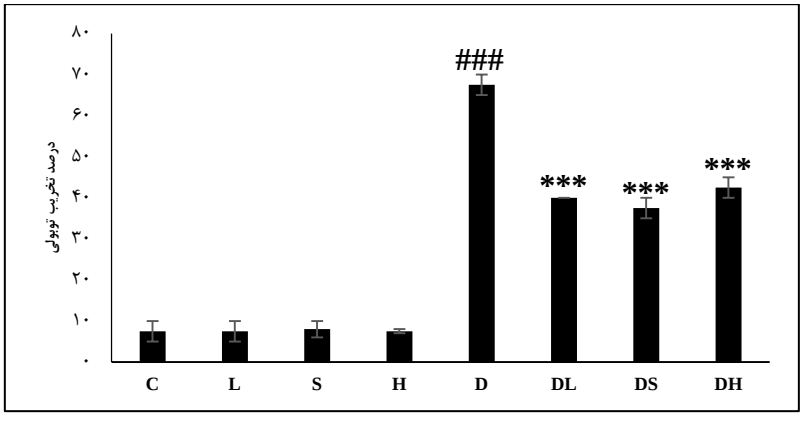
نمودار۳ نشان می‌دهد که گرفتگی عروق ناشی از دیابت در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه و هارمین کاهش یافته است. همچین کاهش معنی‌داری در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه نسبت به گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ مشاهده گردید. تغییر معناداری بین گروه‌های کنترل سالم مشاهده نشد.



نمودار ٤ - نفوذ لوکوسیت بین گروه‌های کنترل و دیابتی

(نمودارها نشان‌دهنده Mean±SE می‌باشند (N=8). *** بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه دیابتی است. ### بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه کنترل سالم می‌باشد).

نمودار٤ نشان می‌دهد که نفوذ لوکوسیت ناشی از دیابت در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه کاهش یافته است. تغییر معناداری بین گروه‌های کنترل سالم مشاهده نشد.



نمودار ٥ - تخریب توبولی بین گروه‌های کنترل و دیابتی

(نمودارها نشان‌دهنده Mean ± SE می‌باشند (N=8). *** بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه دیابتی است. ### بیانگر سطح معنی‌داری p<۰/۰۰۱ با گروه کنترل سالم می‌باشد.

نمودار٥ نشان می‌دهد که تخریب توبولی ناشی از دیابت در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ، دانه و هارمین کاهش یافته است. تغییر معناداری بین گروه‌های کنترل سالم مشاهده نشد.

٤. بحث

هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر مقایسه‌ای عصاره برگ و دانه پگانوم هارمالا و ماده موثره آن به نام هارمین با خاصیت آنتی اکسیدانی بر آسیب‌های ناشی از دیابت در بافت کلیه بود. خاصیت آنتی اکسیدانی بتاکاربولین هارمین توسط Réus و همکارانش در سال ۲۰۱۰ ثابت شد (۲۷).

بررسی‌های بافت‌شناسی در گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ و دانه و هارمین در تغییرات اپی تلیالی، تخریب توبولی، التهاب لوکوسیتی و گرفتگی مویرگی در مقایسه با گروه کنترل سالم

نشان می‌دهد که به شدت در گروه دیابتی، تخریب بافتی صورت گرفته و داروی STZ در کلیه تخریب شدیدی را ایجاد کرده است. این نتایج هم‌راستا با یافته‌های مطالعات Kashihara و همکاران (۲۸) می‌باشد که بیان می‌دارد: استرس اکسیداتیو نقش اساسی در آسیب‌های پاتولوژیک کلیوی دارند. آسیب‌های ناشی از گلومرواسکلروزیس در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده هارمین و عصاره دانه بهتر از گروه‌های دریافت‌کننده عصاره برگ اصلاح شده بود. در گروه دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ، چندان اثر اصلاحی ناشی از این عصاره در بافت کلیوی مشاهده نشد. می‌توان دلیل این موضوع را میزان بسیار پایین بتاکاربولین هارمین در برگ دانست. بنابراین، آنچه در کلیه رت‌های دیابتی دریافت‌کننده عصاره برگ مشاهده می‌شود می‌تواند حتی ناشی از سمیت مواد موجود در این عصاره باشد.

تخریب اپیتلیالی در رت‌های دیابتی به طور قابل توجهی بیش از رت‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ و دانه و نیز هارمین بود و این در حالی است که در گروه هارمین اثرات بهبودی بیشتر مشهود بود. نتایج تحقیق Mahmoudian و همکارانش که نشان می‌دهد پگانوم هارمالا خاصیت سمی دارد و این اثرات در هارمین بسیار کمتر است، در پژوهش حاضر نیز تایید می‌شود. در مطالعه حاضر در گروه‌های دیابتی دریافت‌کننده هارمین و عصاره دانه، اصلاح گشاد شدگی عروق در لوله‌های جمع‌آوری‌کننده دور و نزدیک و طبیعی شدن اندازه گلومرول در گروه‌های دیابتی مشاهده شد. تراکم رگی پیش آمده در بافت کلیه رت‌های دیابتی، در کلیه رت‌های دریافت‌کننده عصاره برگ و هارمین مشاهده نشد. در تایید نتایج پژوهش حاضر، Rezaei و همکاران (۲۹) نشان دادند که عصاره پگانوم هارمالا استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد.

اثرات بهبودی گرفتگی مویرگی تنها در گروه‌های تحت تیمار با عصاره دانه و نیز هارمین مشاهده گردید. هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر، Wang و همکارانش (۲۰۰۵) گزارش کرده‌اند که آلکالوئیدها اثرات محافظتی را بر روی عملکرد کلیه اعمال می‌کنند (۳۰). همچنین Long و همکارانش (۲۰۰۶) گزارش دادند که ترکیبات فلاونوئیدی از نفروتوکسیتی ممانعت کرده و عملکرد کلیه را بهبود می‌بخشند و بازسازی سلول‌های اپیتلیالی توبول اولیه کلیه را توسعه می‌دهند (۳۱). از سویی در تناقض با مطالعه در جوجه‌ها در رژیم غذایی حاوی ۱۰ درصد *P.harmala* و ۱۰% برگ Ballota، در بافت کلیه یک دژنراسیون خفیفی در سلول‌های اپیتلیال لوله پیچیده پروگزیمال مشاهده شد (۳۲). اما هم راستا با نتایج مطالعه حاضر، Mohamed و همکارانش

نشان دادند که در دوزهای بالا عصاره دانه *P.harmala* باعث ایجاد خونریزی در بافت همبند بینابینی کلیه، دژنراسیون و نکروز در لوله‌های کلیه می‌شود. این نتایج حاکی از نشانه‌های مسمومیت با تزریق عصاره *P.harmala* است (۳۲).

در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که در بین گروه دیابتی تحت تیمار با هارمین نفوذ لکوسیت در کلیه کاهش یافته بود. از سویی در ناحیه مدولای کلیه رت‌های دیابتی می‌توان سلول‌های آپوپتوتیک را مشاهده کرد که این سلول‌ها در رت‌های دیابتی دریافت‌کننده عصاره دانه و هارمین کمترند و این نشان داد بتاکاربولین‌های موجود در هارمین و عصاره دانه با خواص آنتی اکسیدانی می‌تواند آپوپتوز را کاهش دهد. این نتایج در تضاد با تحقیقات Zhang و همکارانش (۳۳) می‌باشد که اظهار می‌دارند هارمین اثرات آپوپتوزی دارد. محققین پیشنهاد کردند که اثرات ضد سرطانی یگانوم هارمالا به طور ویژه از طریق اثرات آپوپتوزی آن القا می‌شود (۳۴). اما نتایج مطالعه حاضر را می‌توان هم‌راستا با تحقیقات سلحشور و همکاران (۳۵) دانست که نشان دادند اثرات آنتی اکسیدانی هارمین به صورت افزایش سطح سرمی ظرفیت توتال آنتی اکسیدان قابل مشاهده است. هم‌راستا با مطالعه حاضر، نتایج مختلف نشان می‌دهد که آلکالوئیدها اثرات محافظتی روی عملکرد کلیه دارند. همچنین ترکیبات فلاونوئیدها باعث جلوگیری از آسیب و بهبود عملکرد کلیه می‌شوند و بازسازی سلول‌های اولیه اپیتلیال را توسعه می‌دهند (۳۰، ۳۳). بنابراین، بتاکاربولین هارمین به تنهایی و همچنین در عصاره دانه می‌تواند بهترین نتایج را بر اصلاح بافت کلیوی آسیب‌دیده ناشی از دیابت بر جای گذارد. در مجموع تغییرات اپی تلیالی، التهاب لوکوسیتی و گرفتگی مویرگی در گروه دیابتی تحت تیمار با هارمین نسبت به گروه دیابتی کاهش داشتند، ولی در واقع کلیه در گروه دیابتی تحت تیمار با هارمین نسبت به عصاره برگ آسیب بیشتری دیده بود و این در حالی است که در هیچ یک از گروه‌های کنترل سالم تحت تیمار با داروها در مقایسه با گروه کنترل به لحاظ بافتی، تغییری رخ نداده بود.

۵. نتیجه‌گیری

بتاکاربولین هارمین اثرات آنتی اکسیدانی دارد و این کار را از طریق مهار مکانسیم‌های استرس اکسیداتیو انجام می‌دهد. یکی از دلایل آپوپتوز در سلول‌های دیابتی، ناشی از فعال شدن مسیر فاکتور کاپا هسته‌ای B (NF-Kb) است. طبق نتایج بافتی در تحقیق حاضر، هارمین احتمالا این توانایی را دارد که این مسیر را مهار کند و به این ترتیب جلوی آسیب بافتی را بگیرد و از آنجایی که

میزان بتاکاربولین موجود در عصاره دانه و هارمین به یک اندازه می‌باشد، نتایج تقریبا مشابه است. اما عصاره دانه در اکثر نتایج بهتر عمل کرده است که این را می‌توان به انواع فلاونوئیدها و سایر ترکیبات نیتروژنی موجود در دانه نسبت داد. تحقیقات بیشتر در مورد ترکیبات دانه و اثرات آنها پیشنهاد می‌شود.

٦. تشکر و قدردانی

نویسندگان از آزمایشگاه رازی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

1. Gomez-Perez FJ, Aguilar-Salinas CA, Almeda-Valdes P, Cuevas-Ramos D, Lerman Garber I, Rull JA. HbA1c for the diagnosis of diabetes mellitus in a developing country. A position article. *Archives of medical research*. 2010; 41(4): 302-8.
2. Butler JM, Guthrie SM, Koc M, Afzal A, Caballero S, Brooks HL, et al. SDF-1 is both necessary and sufficient to promote proliferative retinopathy. *J Clin Invest*. 2005; 115(1): 86-93.
3. Asadikaram G, Asiabanha M, Sayadi A, Jafarzadeh A, Hassanshahi G. Impact of opium on the serum levels of TGF-beta in diabetic, addicted and addicted-diabetic rats. *Iranian journal of immunology*. 2010; 7(3): 186-92.
4. Prasad P, Tiwari AK, Kumar KMP, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, et al. Chronic renal insufficiency among Asian Indians with type 2 diabetes: I. Role of RAAS gene polymorphisms. *BMC Medical Genetics*. 2006; 7: (42)1-9.
5. Baek S-S, Kim S-H. Treadmill exercise ameliorates symptoms of Alzheimer disease through suppressing microglial activation-induced apoptosis in rats. J Exerc Rehabi. 2016; 12(6): 34-526. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *International journal of nephrology*. **DOI:** 10.1155/2012/465897, **Corpus ID:** 6159429.
6. Rivero A, Mora C, Muros M, Garcia J, Herrera H, Navarro-Gonzalez JF. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clinical science*. 2009; 116(6): 479-92.
7. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clinical science*. 2013; 124(3): 139-52.
8. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular therapeutics*. 2012; 30(1): 49-59.
9. Murrow JR, Sher S, Ali S, Uphoff I, Patel R, Porkert M, et al. The differential effect of statins on oxidative stress and endothelial function: atorvastatin versus pravastatin. *Journal of clinical lipidology*. 2012; 6(1): 42-9.
10. Maritim AC, Sanders RA, Watkins J. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2003; 17: 24-38.
11. Zhang L, Yang J, Chen XQ, Zan K, Wen XD, Chen H, et al. Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from Potentilla discolor Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *J Ethnopharmacol*. 2010; 132(2): 518-24.
12. Loub WD, Farnsworth NR, Soejarto DD, Quinn ML. NAPRALERT: computer handling of natural product research data. *Journal of chemical information and computer sciences*. 1985; 25(2): 99-103.
13. Mahmoudian M, Rahbar N, Hoormand M, Ebrahimi SA, Madadkar Sobhani A. CYTOTOXICITY OF PEGANUM HARMALA L. SEEDS EXTRACT AND ITS RELATIONSHIP WITH CONTENTS OF ß-CARBOLINE ALKALOIDS. *RJMS*. 2002; 8(26): 432-7.

14. Mina CN, Farzaei MH, Gholamreza A. Medicinal properties of Peganum harmala L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: a review. *Journal of traditional Chinese medicine = Chung i tsa chih ying wen pan.* 2015; 35(1): 104-9.
15. Bremner P, Rivera D, Calzado MA, Obon C, Inocencio C, Beckwith C, et al. Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *J Ethnopharmacol*. 2009; 124(2): 295-305.
16. Tse SY, Mak IT, Dickens BF. Antioxidative properties of harmane and beta-carboline alkaloids. *Biochemical pharmacology*. 1991; 42(3): 459-64.
17. Herraiz T, Chaparro C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications.* 2005; 86(2): 326- 378.
18. Squires PE, Hills CE, Rogers GJ, Garland P, Farley SR, Morgan NG. The putative imidazoline receptor agonist, harmane, promotes intracellular calcium mobilisation in pancreatic beta-cells. *European journal of pharmacology*. 2004; 501(1-3): 31-9.
19. Lee CS, Han ES, Jang YY, Han JH, Ha HW, Kim DE. Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *Journal of neurochemistry.* 2000; 75(2): 521-31.
20. Ahvazi M, Khalighi-Sigaroodi F, Charkhchiyan MM, Mojab F, Mozaffarian V-A, Zakeri H. Introduction of medicinal plants species with the most traditional usage in alamut region. *Iran J Pharm Res.* 2012; 11(1): 185-94.
21. Maher P, Davis JB. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996; 16(20): 6394-401.
22. Moura DJ, Richter MF, Boeira JM, Pegas Henriques JA, Saffi J. Antioxidant properties of beta-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*. 2007; 22(4): 293-302.
23. Fortunato JJ, Reus GZ, Kirsch TR, Stringari RB, Stertz L, Kapczinski F, et al. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2009; 33(8): 1425-30.
24. Komeili G, Hashemi M, Bameri-Niafar M. Evaluation of Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects ofPeganum harmala Seeds in Diabetic Rats. *Cholest* .Volume 2016, **Article ID**: 7389864, **DOI:** https://doi.org/10.1155/2016/7389864.
25. Berdai MA, Labib S, Harandou M. Peganum harmala L. Intoxication in a Pregnant Woman. *Case Reports in Emergency Medicine*. Volume 2014, **Article ID**: 783236, **DOI:** https://doi.org/10.1155/2014/783236
26. Réus GZ, Stringari RB, de Souza B, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Hallak JE, et al. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2010; 3(5): 325-31.
27. Kashihara N, Haruna Y, Kondeti VK, Kanwar YS. Oxidative stress in diabetic

nephropathy. *Current medicinal chemistry*. 2010; 17(34): 4256-69.
28. Rezaei M, Nasri S, Roughani M, Niknami Z, Ziai SA. Peganum Harmala L. Extract Reduces Oxidative Stress and Improves Symptoms in 6-Hydroxydopamine-Induced Parkinson's Disease in Rats. *Iran J Pharm Res.* 2016; 15(1): 275-81.
29. Wang Y, Fu X, Wang X, Jia X, Gu X, Zhang J, et al. Protective effects of anisodamine on renal function in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *The Tohoku journal of experimental medicine.* 2011; 224(2): 91-7.
30. Long M, Qiu D, Li F, Johnson F, Luft B. Flavonoid of Drynaria fortunei protects against acute renal failure. *Phytotherapy research*. 2005; 19(5): 422-7.
31. Mahmood S, Hadi A, Jawad Z, Mohamed S, Jawad Naki Z, Mahmood Jawad S, et al. Effect of repeated administration of Peganum harmala alcoholic extract on the liver and kidney in Albino mice: A histo-pathological study. *Journal of Scientific & Innovative Research.* 2013; 2 (3): 585-597.
32. Zhang J, Zhang Z. Cytotoxic and Apoptotic Activity of the Novel Harmine Derivative ZC-14 in Sf9 Cells. *Int J Mol Sci*. 2018; 19(3): 811-24. **doi:** 10.3390/ijms19030811.
33. Cao MR, Li Q, Liu ZL, Liu HH, Wang W, Liao XL, et al. Harmine induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial signaling pathway. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international.* 2011; 10(6): 599-604.
34. Salahshoor MR, Mahmoudian ZG, Roshankhah S, Farokhi M, Jalili C. Harmine shows therapeutic activity on Nicotine-induced liver failure in mice. *Histology and histopathology.* 2019: 10(97): 1-7.

استناد به این مقاله:

کجباف، فروغ؛ عریان، شهربانو؛ احمدی، رامش؛ عیدی، اکرم (۱۳۹۹). بررسی اثر عصاره متانولی پگانوم هارمالا و هارمین بر آسیب بافتی ناشی از دیابت در کلیه رت‌های نر نژاد ویستار. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۰، شماره ۳۷، ص ۵-۲۲.