

## بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از تجویز عصاره منتا اسپیکاتا در پانکراس رت‌های دیابتی شده با آلوکسان

سونیا ساهویه<sup>۱</sup> عباس جواهری وایقان<sup>۲</sup> محمود احمدی همدانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

<sup>۲</sup> گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

<sup>۳</sup> گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، ایران

(دریافت مقاله: ۲۸ فروردین ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۱۳ تیر ماه ۱۳۹۷)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** با توجه به گسترش روز افزون ابتلا به دیابت و وجود آثار جانبی نامطلوب در استفاده گسترده از داروهای سنتتیک، تحقیقات زیادی در جهت جایگزینی ترکیبات طبیعی با آثار بیولوژیک مشابه انجام می‌گیرد.

**هدف:** هدف از این تحقیق مطالعه تغییرات هیستوپاتولوژیک در پانکراس رت‌های دیابتی شده با آلوکسان و مقایسه اثر عصاره آبی منتا اسپیکاتا و گلی‌بنکلامید بر این تغییرات در جزایر لانگرهانس در این حیوانات است.

**روش کار:** تعداد ۲۴ قطعه رت نر نژاد ویستار در چهار گروه شامل گروه‌های سالم (کنترل منفی)، دیابتی (کنترل مثبت)، دیابتی تیمار شده با  $2\text{mg/kg}$  گلی‌بنکلامید (داروی استاندارد ضد دیابت) و دیابتی تیمار شده با  $300\text{mg/kg}$  عصاره آبی برگ منتا اسپیکاتا توزیع شدند. القاء دیابت از طریق تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونهیدرات ( $150\text{mg/kg}$ ) انجام گرفت. کلیه تیمارها روزانه و از طریق گاواژ به مدت ۲۱ روز بر روی رت‌های دیابتی انجام شد. پس از دوره تیمار از بافت پانکراس همه رت‌ها مقاطع میکروسکوپی تهیه شده و رنگ آمیزی‌های هماتوکسیلین-ئوزین و گوموری انجام گرفت. پس از بررسی‌های کیفی و ثبت تغییرات بوجود آمده در جزایر لانگرهانس، تراکم کل سلول‌ها و تراکم سلول‌های بتا در واحد سطح جزایر و نسبت مساحت جزایر به مساحت زمینه میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی با نرم افزار آماری SPSS تحلیل شدند.

**نتایج:** یافته‌های آماری نشان دادند که عصاره آبی منتا اسپیکاتا در حیوانات دیابتی باعث کاهش گلوکز خون شده و از نظر ممانعت از تخریب سلول‌های بتا در جزایر لانگرهانس تفاوت معنی‌داری با گلی‌بنکلامید ندارد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** عصاره آبی منتا اسپیکاتا به علت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی قوی می‌تواند مانع اثر تخریبی شدید رادیکال‌های آزاد بر روی سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس شود. بر این اساس در صورت تایید در تحقیقات تکمیلی در مورد مصرف دراز مدت این عصاره، می‌توان از آن به عنوان جایگزینی برای داروهای شیمیایی استفاده کرد.

**واژه‌های کلیدی:** آلوکسان، منتا اسپیکاتا، سلول بتا، پانکراس، گلی‌بنکلامید

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله تحقیقات دامپزشکی محفوظ است.

(\* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۳-۳۳۶۵۴۲۱۴، نمابر: ۰۲۳-۳۳۶۵۴۲۱۵، Email: ajavaheri@semnan.ac.ir

### How to Cite This Article

Sahvieh, S., Javaheri Vayeghan, A., Ahmadi Hamedani, M. (2019). Evaluation of Pancreatic Histopathological Changes Due to Administration of *Mentha spicata* Extract in Alloxan-Induced Diabetic, Iran. *J Vet Res*, 73(4), 383-391. doi: 10.22059/jvr.2018.221015.2542



## مقدمه

اسیداوریک حاصل شده و قادر به تخریب سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس از طریق تولید رادیکال‌های آزاد سوپر-اکسید و هیدروژن پراکسید و القاء آپوپتوز و ایجاد دیابت است (۱، ۱۱، ۱۹، ۲۴). این مطالعه بر مبنای تکیه بر ظرفیت بالای آنتی-اکسیدانی عصاره منتا اسپیکاتا جهت بررسی تأثیر مصرف این عصاره در مقایسه با داروی گلی‌بنکلامید بر تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از اثر آلوکسان بر پانکراس رت‌های دیابتی انجام شده است.

## مواد و روش کار

عصاره منتا اسپیکاتا به روش استاندارد از برگ‌های این گیاه تهیه شده و LD<sub>50</sub> آن با گایدلاین OECD به شماره ۴۲۳ به مقدار ۱۵۰۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محاسبه شد. ۲۰٪ از این مقدار عصاره به میزان ۳۰۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای انجام مطالعه در نظر گرفته شد. تعداد ۲۴ قطعه رت نر نژاد ویستار به وزن ۱۸۰±۲۰ g انتخاب شده و به صورت تصادفی در چهار گروه شش تایی دسته‌بندی شدند. گروه اول رت‌های سالم (کنترل منفی) بودند که به این گروه در طی آزمایش سرم فیزیولوژی به مقدار ۱۰ ml/kg تزریق شد. گروه دوم رت‌های دیابتی شده با آلوکسان (کنترل مثبت)، گروه سوم رت‌های دیابتی و درمان شده با گلی‌بنکلامید به مقدار ۲ mg/kg و گروه چهارم گروه دیابتی و درمان شده با عصاره آبی منتا اسپیکاتا به مقدار ۳۰۰ mg/kg بودند. القاء دیابت در گروه‌های ۳ و ۴ از طریق تزریق داخل صفاقی محلول آلوکسان مونوهیدرات به میزان ۱۴۰ mg/kg انجام شد. پس از تثبیت قندخون ناشتای رت‌ها در بالای ۱۳۰ mg/kg گروه‌های مذکور تحت درمان‌های مورد نظر قرار گرفتند. اندازه‌گیری قند خون ناشتا در روزهای ۷ و ۱۴ و ۲۱ نیز تکرار شد. به گروه سوم از روز ششم به بعد به مدت ۱۵ روز گلی‌بنکلامید و به گروه چهارم نیز عصاره منتا اسپیکاتا به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی تجویز شد. در روز ۲۲ پانکراس همه نمونه‌ها طی کالبد گشایی خارج شده و از هر کدام از پانکراس‌ها ۲ قطعه نمونه مناسب انتخاب شده و از هر کدام از نمونه‌ها ۴ برش به ضخامت ۶ میکرون و با رعایت فاصله مناسب برش‌ها از هم تهیه شد. نیمی از این برش‌ها با H&E و نیم دیگر با روش گومری برای تفریق سلول‌های  $\alpha$  و  $\beta$  رنگ‌آمیزی شدند. مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E در گروه‌های مختلف از نظر تعداد و اندازه جزایر لانگرهانس، تراکم سلولی در این جزایر، مقایسه نسبت اندازه جزایر به اندازه بافت پانکراس و همچنین حضور تغییرات التهابی و تغییرات آپوپتوتیک مورد توجه قرار گرفتند. در مقاطع رنگ‌آمیزی شده با رنگ آمیزی افتراقی گومری تغییرات ایجاد شده در تعداد و نسبت سلول‌ها در نواحی مختلف جزایر بر اساس محل‌های کلاسیک حضور سلول‌های آلفا و بتا مورد توجه قرار گرفتند. مقایسه آماری بین گروه‌های مختلف نمونه‌ها از نظر وسعت جزایر، تراکم سلولی در جزایر، نسبت سلول‌های آلفا و بتا به مساحت جزایر با استفاده از آزمون‌های آنالیز

دیابت ملیتوس یک رخداد اپیدمی در بزرگسالان است که در طی آن نقص در ترشح انسولین یا عملکرد آن منجر به افزایش قند خون و متعاقب آن اختلالات کلیوی، حمله قلبی، کوری و قطع اعضای حرکتی پایینی بدن می‌شود. این بیماری در بین مردم جهان از ۱۷۱ میلیون نفر در سال ۲۰۰۰ به ۳۶۶ میلیون نفر در سال ۲۰۳۰ رو به افزایش خواهد بود. در حال حاضر دیابت چهارمین علت اصلی مرگ در اغلب کشورهای پیشرفته می‌باشد (۲۱). در ایران دو میلیون نفر مبتلا به دیابت تشخیص داده شده‌اند (۱۴) ولی به نظر می‌رسد با توجه به نوع جیره غذایی و عدم تشخیص در سطح گسترده میزان ابتلا بسیار بیش از این تعداد باشد. دیابت ملیتوس به عنوان یک بیماری مزمن خودایمن باعث تخریب پیش‌رونده سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس که تولید کننده انسولین هستند می‌شود (۲۶). علت اصلی مرگ و میر در دیابتی‌ها تجمع چربی در حاشیه رگ‌های بزرگ و کوچک و آترواسکلروز ناشی از آن می‌باشد (۳۲). عوارض دیابت شامل هایپرگلیسمی مزمن، پلی‌وری، پلی‌دیسی، پلی‌فازی، ضعف و لاغری است (۲۹، ۱۳). در دیابت افزایش محصولات استرس اکسیداتیو خطر اصلی برای سلول‌های بتا محسوب می‌شود (۱۵). درمان اولیه این عوارض شامل کنترل رژیم غذایی، ورزش و استفاده از داروها و رژیم‌های کاهش دهنده قند و چربی خون می‌باشد (۶). داروهای مورد استفاده برای مقابله با دیابت شامل سولفونیل‌اوره‌ها، باگوآنیدین‌ها، گلنیدها و مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز هستند که عوارض جانبی متعددی نظیر بروز شوک‌هایپوگلیسمیک، افزایش ذخایر چربی و تخریب کبد و کلیه‌ها دارند (۲، ۴، ۲۲، ۳۱، ۳۲). با توجه به عوارض نامطلوب هر کدام از روش‌های درمانی مدیریت دیابت با مضرات کمتر هنوز چالش برانگیز است (۱۵). گلی‌بنکلامید به عنوان داروی مؤثر در درمان دیابت ملیتوس از طریق افزایش ترشح انسولین به واسطه متوقف کردن کانال‌های پتاسیمی حساس به آدنوزین تری فسفات در سلول‌های پانکراس مورد استفاده قرار می‌گیرد (۹). مصرف دراز مدت این دارو منجر به بروز عوارض قلبی-عروقی و تغییراتی در عملکرد اندوتلیوم عضله صاف و تحریک سلول‌های اندوتلیال به پرولیفراسیون می‌شود. اثر کاهش‌دهندگی قند خون در بسیاری از گیاهان دارویی از جمله جنس منتا در مدل‌های حیوانی و مطالعات بالینی بررسی شده و مورد تأیید قرار گرفته است (۳، ۸، ۲۵). منشأ منتا اسپیکاتا از خانواده لامباسه آ و از شرق آسیاست. دو نوع منتا در این خانواده وجود دارد که به نام‌های منتا اسپیکاتا و منتا پایپریتا می‌باشند (۲۷، ۲۸). ترکیبات به‌دست آمده از منتا شامل: کارونه، لیمونه، سیس کاروتول، ۱ و ۸ سینئول، سیس‌دهیدرو کاروتول، کارویل استات، سیس‌سابیننه هیدرات عموماً از روغن‌های فرار هستند. منتا دارای آنتی‌اکسیدانی قوی به نام اسید رزمارینیک می‌باشد که در درمان بیماری‌های التهابی ریه، آرتريت اتوایمیون و بیماری‌های قلبی کاربرد دارد. تجویز خوراکی منتا پایپریتا اثر هیپوگلیسمیک معنی‌داری را در موش‌های دیابتی شده با آلوکسان می‌تواند ایجاد کند (۲). آلوکسان از اکسیداسیون



جدول ۱. مقایسه اثر گلی بن کلامید با اثر عصاره منتا اسپیکاتا بر غلظت گلوکز خون (mg/dLit) رت‌ها در گروه‌های مختلف.

گروه	تحت درمان	قبل از القا دیابت	روز صفر	روز هفتم	روز چهاردهم	روز بیست و یکم
۱	سرم فیزیولوژی	۷۹/۲۵±۲/۸۶	۷۹/۵۰±۲/۳۹	۷۹/۰۰±۲/۷۳	۷۸/۰۰±۲/۲۷	۷۲/۷۵±۴/۰۲
۲	کنترل دیابتی	۸۳/۲۵±۴/۱۷	۱۳۴/۵۰±۲/۹۸	۱۳۴/۵۰±۳/۴۲	۱۳۶/۰۰±۲/۱۶	۱۳۹/۷۵±۳/۳۲
۳	گلی بن کلامید	۸۰/۱۶±۷/۴۹	۱۴۰/۳۳±۷/۳۳	۱۲۳/۱۶±۳/۷۲	۱۲۲/۸۳±۲/۸۳	۱۱۳/۸۳±۳/۶۸
۴	منتا اسپیکاتا	۸۲/۰۰±۵/۲۴	۱۳۶/۰۰±۳/۳۱	۱۲۷/۶۶±۳/۰۹	۱۰۸/۱۶±۵/۴۷	۱۰۷/۸۳±۴/۳۱

جدول ۲. مقایسه نسبت سلول‌های بتا به کل سلول‌ها، تراکم سلول‌های بتا در واحد سطح (mm<sup>2</sup>)، تراکم کل سلول‌ها در واحد سطح (mm<sup>2</sup>) و نسبت سطح جزایر به سطح بافت پانکراس، در گروه‌های مختلف.

ردیف	گروه‌ها	سلول‌ها/بتا/کل سلول‌ها	تراکم سلول‌های بتا در واحد سطح	تراکم کل سلول‌ها در واحد سطح	مساحت جزایر / مساحت زمینه مشاهده
۱	کنترل منفی (گروه ۱)	۰۲/±۶۸/۰	۴۶/۱۶۳±۹۳/۲۹۱۶	۱۷/۲۳۵±۳۷/۴۱۹۷	۰۰۴/±۰۲۸/۰
۲	کنترل مثبت (گروه ۲)	۰۵/±۳۶/۰	۱۷/۲۰۲±۹۰/۱۴۴۲	۲۶/۲۲۵±۷۹/۲۳۰۵	۰۰۷/±۰۰۶/۰
۳	گلی بن کلامید (گروه ۳)	۰۴/±۶۲/۰	۶۴/۲۲۵±۵۵/۲۶۵۶	۲۰/۲۴۷±۶۶/۳۵۴۲	۰۰۵/±۰۱۸/۰
۴	منتا اسپیکاتا (گروه ۴)	۰۴/±۵۷/۰	۹۸/۱۹۰±۵۵/۲۱۹۸	۲۴۵/±۲۵/۳۴۲۹	۰/±۰۰۵±۰۱۶/۰

واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی در نرم افزار آماري SPSS انجام گرفت. اندازه‌گیری وسعت جزایر و مساحت فیله‌های میکروسکوپی با استفاده از نرم افزار AxioVision LE انجام گرفت. در این تحقیق سعی شده است با مشاهده تعداد هر چه بیشتری از جزایر در نمونه‌های متنوع تهیه شده از نواحی مختلف پانکراس نمونه‌ها امکان اشتباه را به حداقل رساند.

## نتایج

در جدول ۱ اثر گلی بن کلامید با اثر عصاره منتا اسپیکاتا بر گلوکز خون رت‌های گروه‌های مختلف مقایسه شده است. در طی مصرف گلی بن کلامید در گروه ۳ و عصاره منتا اسپیکاتا در گروه ۴ تا روز بیست و یکم میزان گلوکز خون به شدت کاسته شده است. به طوری که در روز هفتم اختلاف میزان قند خون بین گروه کنترل دیابتی و گروه‌های ۳ و ۴ معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). همچنین در روزهای چهاردهم و بیست و یکم نیز بین گروه‌های ۲ و ۳ و ۴ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد.

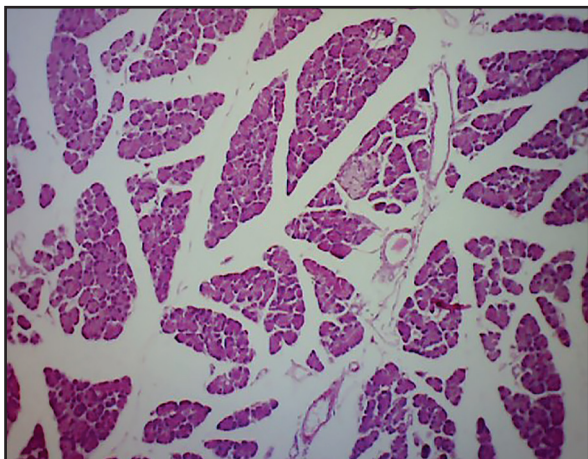
مشاهده مقاطع رنگ آمیزی شده با H&E نشان داد که اندازه سطح جزایر در گروه‌های مختلف و در نواحی مختلف یک شان میکروسکوپی تفاوت زیادی با هم دارند (تصویر ۱). با توجه به احتمال برش و تهیه مقطع از نواحی مختلف جزایر این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت اندازه واقعی جزایر بوده یا در اثر بریده شدن از مناطق مختلف ایجاد شده باشد. در این تحقیق برای جلوگیری از تأثیر این احتمال در نتایج در همه نمونه‌ها موارد متعددی برش میکروسکوپی با فواصل منظم از بلوک‌ها تهیه شده و در هر برش نیز چندین زمینه میکروسکوپی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در زمینه تفاوت در اندازه جزایر، بخصوص در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل منفی اندازه جزایر به وضوح کوچک‌تر بودند. برآیند کلی مشاهده مقاطع در گروه‌های مختلف نشان داد که اندازه سطح جزایر در گروه کنترل دیابتی نسبت به سایر گروه‌ها کوچک‌تر بوده و بین لبول‌ها

نیز فاصله بیشتری مشاهده می‌شود (تصویر ۲). با توجه به تفاوت پروتکل درمانی، اندازه جزایر موجود در گروه‌های ۳ و ۴ تفاوت معنی‌داری را با نمونه‌های گروه ۱ نشان نمی‌دادند (تصاویر ۳، ۴) و (جدول ۲). محل حضور سلول‌های بتا به صورت غالب در مناطق مرکزی جزایر و محل استقرار سلول‌های آلفا بیشتر در حاشیه جزایر است. در رنگ آمیزی با روش گوموری نیز که در آن سلول‌های آلفا به رنگ قرمز و سلول‌های بتا به رنگ آبی رنگ آمیزی می‌شوند (تصویر ۵). در مشاهدات میکروسکوپی در نمونه‌های کنترل دیابتی نسبت به موارد کنترل منفی تراکم سلولی کاهش یافته بود. ضمن اینکه در بخش‌های مرکزی جزایر بزرگ‌تر که اصولاً باید محل استقرار سلول‌های بتا باشد این کاهش تراکم بیشتر بود (تصویر ۶). در اغلب نمونه‌ها هسته‌های تعداد قابل توجهی از سلول‌ها به صورت پیکنوز و با کروماتین فشرده خودنمایی می‌کردند. همچنین بخش قابل توجهی از سلول‌های جزایر حاوی سیتوپلاسم کف آلود و غیریکنواخت و بعضاً فاقد هسته بودند که می‌تواند بیانگر کاربویوز و حذف هسته‌ها و ادامه روند تحلیل سلولی باشد. در موارد متعددی از نمونه‌های کنترل دیابتی اطراف هسته‌های پیکنوز را سیتوپلاسم متمایل به ارغوانی صورتی و با حجمی بسیار کمتر از سلول‌های طبیعی فرا گرفته بود که به عنوان اجسام آپوپتوتیک می‌تواند بیانگر وقوع آپوپتوز در بافت مورد مشاهده باشد (تصویر ۶). در تعدادی از شان‌های میکروسکوپی در نمونه‌های کنترل دیابتی شواهدی از جایگاه‌های استقرار جزایر به صورت حفره‌های توخالی دیده می‌شد که بیانگر حذف و جدا شدن جزایر از متس بافت در روند تهیه مقطع بودند. این مسئله می‌تواند نشان‌دهنده کاهش اتصال جزایر با بافت اطراف خود و بیانگر بروز آتروفی در جزایر و آغاز روند حذف آن‌ها باشد (تصویر ۷).

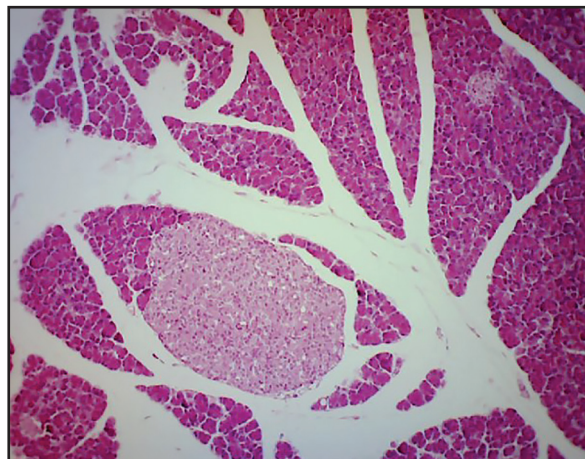
در هیچ کدام از نمونه‌ها نشانه‌ای از بروز التهاب و پرخونی شدید مشاهده نشد که نشان می‌دهد کاهش حجم جزایر و کاهش تراکم سلولی در آن‌ها می‌تواند به علت فعال شدن روند آپوپتوز ناشی از آزاد شدن رادیکال‌های آزاد باشد. افزایش تعداد هسته‌های پیکنوز و قطعات متراکم کروماتینی



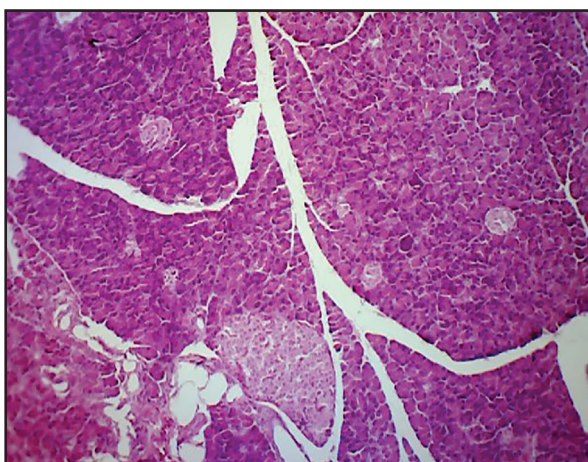




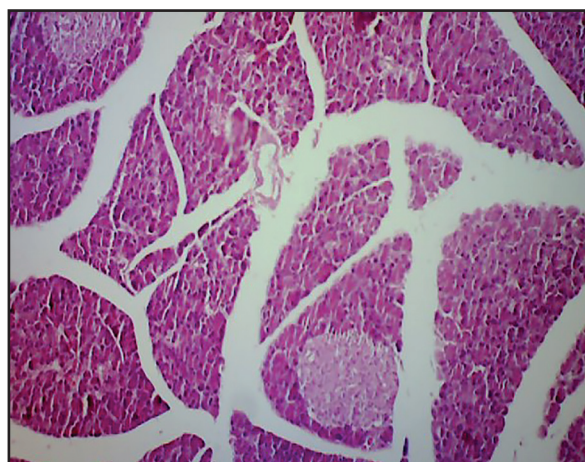
تصویر ۲. پانکراس رت در گروه دیابتی. کوچک بودن جزایر و افزایش فاصله بین لبول‌های پانکراس در این تصویر مشخص است. بزرگ‌نمایی ۱۰۰× رنگ‌آمیزی H&E.



تصویر ۱. پانکراس رت، گروه کنترل منفی در این تصویر یک جزیره لانگرهانس بزرگ و سالم و یک جزیره کوچک مشاهده می‌شود. بزرگ‌نمایی ۱۰۰× رنگ‌آمیزی H&E.



تصویر ۴. پانکراس رت تیمار شده با منتا‌اسپی‌کاتا. نوع اندازه جزایر به خوبی قابل مشاهده است. بزرگ‌نمایی ۱۰۰× رنگ‌آمیزی H&E.



تصویر ۳. پانکراس رت تیمار شده با گلی‌بنکلامید. در این تصویر تراکم بیشتری از سلول‌ها در جزایر در مقایسه با گروه کنترل دیابتی دیده می‌شود. بزرگ‌نمایی ۴۰۰× رنگ‌آمیزی H&E.

قرار گرفتند. بررسی آماری نشان داد که تراکم سلولی در نمونه‌های کنترل منفی (سالم) با اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) بیشتر از نمونه‌های دیابتی بود. در گروه‌های ۳ و ۴ نیز این تراکم کمتر از گروه کنترل منفی ولی بیش از گروه کنترل دیابتی بود ولی اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های اخیر مشاهده نشد. با توجه به تفریق سلول‌های آلفا از سلول‌های بتا در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با گوموری، مشاهدات نشان داد که تراکم سلول‌های آلفا در نمونه‌های مختلف از گروه‌های متفاوت اختلاف چندانی با هم ندارند. با توجه به کاهش کلی تعداد سلول‌ها در جزایر در نمونه‌های کنترل مثبت، این کاهش صرفاً می‌تواند مربوط به کاهش سلول‌های بتا باشد. کاهش کلی تراکم سلولی و کاهش نسبی سلول‌های بتا در جدول ۲ نشان داده شده است.

### بحث

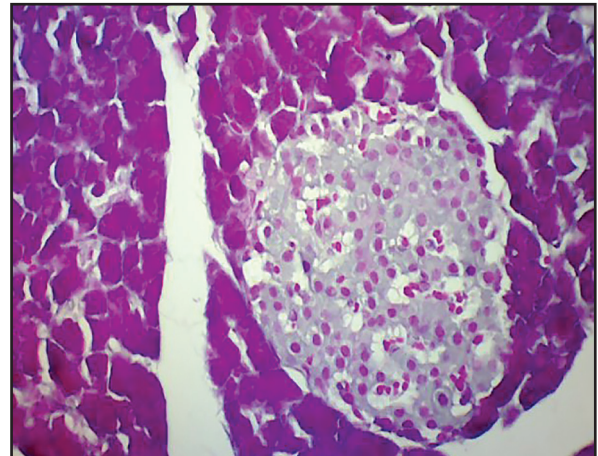
آلوسان به طور گسترده در القاء دیابت وابسته به انسولین در مدل‌های مختلف حیوانی استفاده می‌شود و این اثر از طریق تولید رادیکال‌های آزاد

در سطح جزایر در گروه کنترل دیابتی می‌تواند نشانه افزایش آپوپتوز باشد. در مشاهده کلی بخش قابل ملاحظه‌ای از سطح شان‌ها را در گروه کنترل دیابتی سطوح خالی موجود در بینابین لبول‌های پانکراس تشکیل می‌داد. به نظر می‌رسد این پدیده ناشی از تحلیل جزایر و جمع شدن لبول‌های پانکراس باشد. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است برآوردهای عددی در اندازه گیری دقیق سطح کلی جزایر در لام‌های رنگ‌آمیزی شده با H&E نشان داد که اندازه کلی سطح این جزایر در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل منفی و گروه‌های درمان شده با گلی‌بنکلامید و عصاره منتا‌اسپی‌کاتا کمتر است و بین اندازه این جزایر در گروه کنترل دیابتی با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ( $P < 0/05$ ) ولی با وجود بزرگ‌تر بودن اندازه متوسط این جزایر در گروه کنترل منفی نسبت به گروه‌های ۳ و ۴ تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نمی‌شود. همچنین متوسط اندازه جزایر در گروه ۳ بیش از متوسط اندازه جزایر در گروه ۴ و البته بدون وجود اختلاف آماری معنی‌دار بود. گروه‌های مورد آزمون در این تحقیق از نظر تراکم سلول‌ها در هر میلی‌متر مربع از جزایر نیز مورد مقایسه

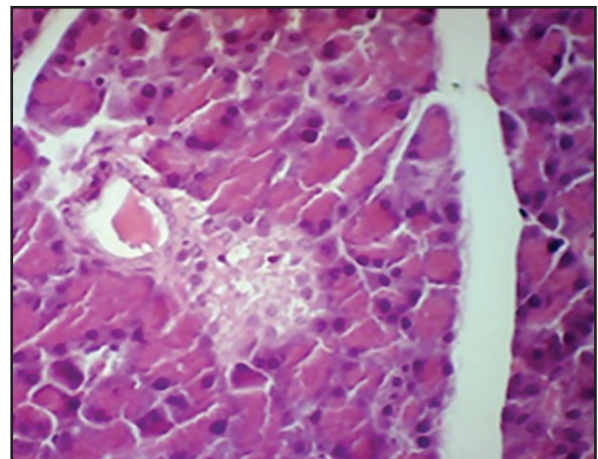




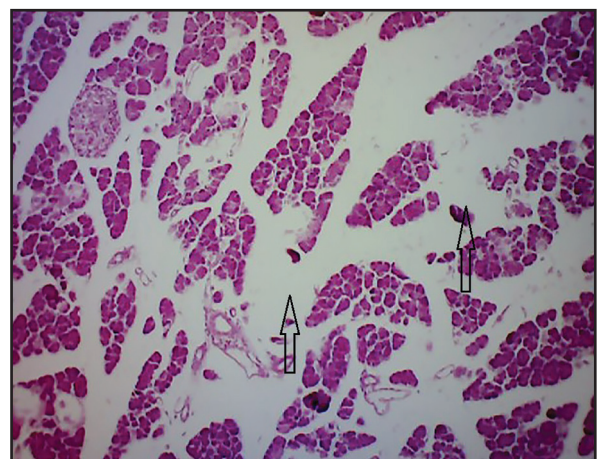
سیتوکروم C منجر به القاء آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد (۱۶). مطالعات گذشته نشان دادند که بسیاری از گیاهان اثرات سودمندی بر روی کنترل قند خون و سطح چربی پلاسما دارند (۵، ۳۰). خانواده لامیاسه آبه علت خواص آنتی‌اکسیدانی خوبی که دارند به طور گسترده برای اهداف گوناگون مورد استفاده است. این گروه از گیاهان در ایران به عنوان جوشانده و چای گیاهی استفاده می‌شوند (۲۳). منتا پایپریتا یکی از ۱۰ گیاهی است که به طور گسترده در برزیل استفاده می‌شود (۵). این گیاه در درمان کاهش اشتها، سرماخوردگی، بروشیت، تب و تهوع مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). توان آنتی‌اکسیدانی منتا اسپیکاتا در مطالعه‌ای توسط Jebeli در سال ۲۰۱۳ انجام گرفته و بر بالا بودن این خصوصیت تاکید شده است ولی در مورد تأثیر آن بر کاهش اثرات نامطلوب ناشی از دیابت گزارشی مشاهده نشده است. El-Desouki و همکاران در سال ۲۰۱۵ در گزارشی از مشاهدات میکروسکوپی پانکراس رت‌های دیابتی شده با آلوکسان وجود مناطق نکروزه و تراکم فیبر در سطح جزایر و هم‌چنین واکنش شدن سلول‌های جزایر و تراکم فیبر در اطراف رگ‌های خونی را گزارش کردند. در این مطالعه واکنش شدن سلول‌ها به وضوح قابل مشاهده بود ولی تراکم فیبر در اطراف رگ‌های خونی و نکروز گسترده مشاهده نشد. از آن‌جا که تأثیر آلوکسان بر سلول‌ها منجر به بروز آپوپتوز می‌گردد بروز نکروز یا شروع روند فیبروز در این شرایط چندان محتمل به نظر نمی‌رسد. در این مطالعه هم‌چنین در جزایر لانگرهانس رت‌های دیابتی کاهش تعداد سلول‌ها در واحد سطح و هم‌چنین واکنش شدن سلول‌ها مشاهده شد. مطالعات Angel و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان داد که پیرمینت اثر قابل توجهی در کاهش قند خون دارد. در این مطالعه نیز اثبات شد که عصاره منتا اسپیکاتا می‌تواند در بهبود آثار دیابت ملیتوس مؤثر واقع گردد. Sai Sailesh و Kumar در سال ۲۰۱۴ اثرات خانواده منتا در درمان دیابت را مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند که منتا به واسطه تحریک بیشتر سلول‌های بتا تخریب نشده و بازسازی سلول‌های تخریب شده سبب کاهش قندخون در رت‌ها می‌شود. در مطالعه حاضر شاهدی مبنی بر توانایی تکثیر سلولی برای سلول‌های بتا از طریق وجود عصاره منتا اسپیکاتا مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد تنها اثری که عصاره منتا اسپیکاتا بر روی سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس دارد این است که از طریق اعمال اثر آنتی‌اکسیدانی بالا از آثار مخرب رادیکال‌های آزاد بر روی سلول‌های بتا جلوگیری به عمل می‌آورد. Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعات هیستوپاتولوژیک بیان کردند که در رت‌های دیابتی شده با آلوکسان آسیب شدیدی به جزایر لانگرهانس وارد شده و کاهش ابعاد جزایر نیز مشاهده شد. هم‌چنین افزایش سطح قند خون و تری‌گلیسیرید و کلسترول تام را به اثبات رساندند. Suni و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سطح قند خون نیز در رت‌های دیابتی شده با آلوکسان افزایش پیدا کرده و جزایر لانگرهانس پانکراس رت‌های دیابتی کاهش واضحی در تعداد سلول‌های بتا و آتروفی سلول‌های بتا داشته است.



تصویر ۵. پانکراس رت گروه کنترل منفی با رنگ آمیزی گوموری. هسته‌هایی که رنگ قرمز به خود گرفته‌اند عموماً هسته‌های سلول‌های آلفا هستند. بزرگ‌نمایی ۴۰۰×. رنگ آمیزی H&E.



تصویر ۶. پانکراس رت دیابتی، کاهش جمعیت سلولی و تراکم هسته‌ها در جزایر مشاهده می‌شود که می‌تواند ناشی از بروز آپوپتوز باشد. بزرگ‌نمایی ۴۰۰×. رنگ آمیزی H&E.



تصویر ۷. پانکراس رت دیابتی. وجود مناطق خالی (نوک پیکان‌ها) در بافت پانکراس به شکل فضاهای گرد در تصویر دیده می‌شود. بزرگ‌نمایی ۴۰۰×. رنگ آمیزی H&E.

به ظهور می‌رسد (۷). این ترکیب از طریق افزایش کلسیم آزاد سیتوزول سلول‌های بتا با افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندری و در نتیجه خروج



## تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت و پرسنل محترم پژوهشی دانشگاه سمنان، همکار گرامی آقای دکتر اشکان جبلی جوان و آقای مهندس مرتضی صابری کارشناس آزمایشگاه تهیه مقاطع و خانم دکتر مهسان بیانی جهت همکاری در اجرای این پژوهش تقدیر و تشکر به عمل می‌آورند.

## تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Akdogan M., KWIWnc, I., Oncu, M., Karaoz, E., Delibas, N. (2003). Investigation of biochemical and histopathological effects of *Mentha piperita* L. and *Mentha spicata* L. on kidney tissue in rats. *Hum Exp Toxicol*, 22(4), 213-219.
2. Angel, J., Sai Sailesh, K., Mukkadan, J. K. (2013). A study on anti-diabetic effect of peppermint in alloxan induced diabetic model of wistar rats. *J Clin Biomed Sci*, 3(4), 177-181.
3. Ashko, K., Rao, J. (2002). Diabetes mellitus and multiple therapeutic of phytochemical. *Curr. Sci*, 1(83), 30-38.
4. Ashraf, H., Heidari, R., Nejati, V., Ilkhanipoor, M. (2013). Effects of aqueous extract of *Berberis integerrima* root on some physiological parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iran J Pharm Res*, 12(2), 425-434.
5. Barbalho, S., Machado Spada, A. P., Prado de Oliveira, E., Emilio Paiva-Filho, M., Aparecida Martuchi, K., Coelho Leite, N., Maeda Deus, R., Sasaki, V., Silva Braganti, L., Oshiiwa, M. (2011). Metabolic Profile of Offspring from Diabetic Wistar Rats Treated with *Mentha piperita* (Peppermint). Effect of ethanolic extract of *Pisonia alba* span leaves on blood glucose levels and histological. *IJARNP*, 52(5), 1137-1143.
6. Bhatnagar, D. (1998). Lipid-lowering drugs in the management of hyperlipidemia. *Pharmacol Ther*, 79(3), 205-230.
7. Bhattacharya, S., Manna, P., Gachhui, R., C. Sil, P. (2011). D-saccharic acid-1,4-lactone ameliorates alloxan-induced diabetes mellitus and oxi-

تغییرات دژنراتیو عروقی در جزایر در رت‌های دیابتی بیان گردید. همچنین در رت‌های درمان شده با گلی‌بنکلامید افزایش قابل توجهی در تعداد جزایر در مقایسه با دیابتی‌های درمان نشده دیده شد. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر نیز تایید کننده اثر درمانی عصاره نعنا بر روی رت‌های دیابتی بوده و آثار درمانی عصاره نعنا را نزدیک به گلی‌بنکلامید معرفی می‌کند. البته با وجود این همخوانی در نتایج در این تحقیق آثاری از تغییرات دژنراتیو در عروق بافت پانکراس مشاهده نشد. در مطالعه Jelodar و همکاران در سال ۲۰۰۷ تراکم سلول‌های بتا، تراکم جزایر، نسبت سلول‌های بتا به کل سلول‌ها، تعداد جزایر در هر میلی‌متر مربع و اندازه متوسط جزایر بررسی شده و نتیجه این بود که در رت‌های دیابتی همه این موارد کاهش یافته است. تغییرات هسته اعم از پیکنوز و کاربولیز، بخصوص در اطراف رگ‌های بزرگ و کاهش شدید در تعداد سلول‌های بتا نیز توسط این محقق گزارش شده است این مطالعه نیز با استفاده از رنگ‌آمیزی تفریقی گومری نشان داد که نسبت سلول‌های بتا به کل سلول‌ها سلول‌ها در بافت جزایر نمونه‌های دیابتی کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل منفی دارد در حالی که این تفاوت بین گروه‌های درمان شده با گلی‌بنکلامید و عصاره نعنا فاقد اختلاف معنی‌دار است. در مقاطع رنگ‌آمیزی شده با H&E در این تحقیق نیز کاهش تراکم سلول‌های بتا و کاهش اندازه جزایر در رت‌های دیابتی دیده شده و همچنین تغییرات هسته مانند پیکنوز و کاربولیز هسته در رت‌های دیابتی شده بررسی و اثبات گردید. در نتایج این طرح شواهد کافی مبنی بر بروز آپوپتوز نیز در این جزایر مانند تراکم و خرد شدن هسته‌ها و وجود سیتوپلاسم ائوزینوفیلی در اطراف قطعات هسته ارائه شده است. در مطالعه حاضر نشانه‌ای مبنی بر توانایی القاء تکثیر سلولی برای سلول‌های بتا از طریق عصاره منتا اسپیکاتا مانند حضور مراحل از تقسیمات میتوزی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: در واقع اثری که عصاره منتا اسپیکاتا بر روی سلول‌های بتا جزایر لانگرهانس از خود نشان داد ناشی از اثر آنتی‌اکسیدانی زیاد آن بوده که در مطالعات قبلی بر آن تاکید شده است و به نظر می‌رسد که از این طریق از گسترش آثار مخرب رادیکال‌های آزاد بر روی سلول‌های بتا جلوگیری به عمل می‌آورد و استفاده از آن در طول مدت انجام این تحقیق توانسته است باعث بازیافت توانایی این سلول‌ها در تولید انسولین کافی بشود. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و با عنایت به اثر آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌دیابتیک این عصاره به نظر می‌رسد در صورت انجام تجربیات بیشتر به خصوص در زمینه تخلیص مواد مؤثر آنتی‌اکسیدان موجود در این عصاره و در صورت اثبات کمتر بودن اثرات جانبی نامطلوب این عصاره در مصرف دراز مدت در مقایسه با داروی گلی‌بنکلامید و داروهای شیمیایی با اثرات مشابه میتوان نسبت به تهیه داروی کاربردی مناسب برای کاهش قند خون و تعدیل اثرات نامطلوب دیابت از این گیاه امیدوار بود



- dative stress in rats through inhibiting pancreatic beta-cells from apoptosis via mitochondrial dependent pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 25(2), 272-283.
8. Chakravarthy, B. K., Gupta, S., Gambhir, S. S., Gode, K. D. (1981). Pancreatic beta cell regeneration in rats by epicatechin. *Lancet*, 2(8249), 759-760.
  9. Chan, W. K., Yao, X., Ko, W. H., Huang, Y. (2000). Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation induced by glibenclamide in rat isolated aorta. *Cardiovas Res*, 46(1), 180-187.
  10. Dunn, J. S., McLetchie, N. G. B. (1943). Experimental alloxan diabetes. *Lancet*, 2(242), 384-387.
  11. Dunn, J. S., Sheehan, H. L., McLetchie, N. G. B. (1943). Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet*, 241(6242), 484-487.
  12. El-Desouki, N. I., Tabl, G. A., Abdel-Aziz, K. K., Salim, E. I., Nazeeh, N. (2015). Improvement in beta-islets of Langerhans in alloxan-induced diabetic rats by erythropoietin and spirulina. *JBAZ*, 71: 20-31.
  13. Eno-obong, B., Samson, O., Asuquo, I (2014). Histopathological assessment of the kidney of alloxan induced diabetic rat treated with macerated *Allium sativum* (garlic). *AJBPS*, 4(35), 13-17.
  14. Esteghamati, A., Gouya, M. M., Abbasi, M., Delavari, A., Alikhani, S., Alaedini, F. (2008). Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in the adult population of Iran. *Diabetes care*, 31(1), 96-98.
  15. Gupta, J. K., Mishra, P., Rani, A., Mitra Mazumder, P. (2010). Blood glucose lowering potential of stem bark of *Berberis aristata* Dc in alloxan-induced diabetic rats. *Iran J Pharmacol Ther*, 9(1), 21-24.
  16. Hashemi, M., Dostar, Y., Rohani, S. R., Azizi Saraji, A. R., Bayat, M. (2009). Influence of Alloxanes on the Apoptosis of Pancreas B-Cells of Rat. *WJMS*, 4(2), 70-73.
  17. Javan, A.J. (2013) Evaluation of antioxidant capacity of the ethanol extract of Iranian *Mentha spicata*. *Scientific Reports*, 2(4):1-3.
  18. Jelodar, G., Maleki, M., Shahram, S. (2007). Effect of walnut leaf, coriander and pomegranate on blood glucose and histopathology of pancreas of alloxan induced diabetic rats. *AJTAM*, 4(3), 299-305.
  19. Jorns, A., Munday, R., Tiedge, M., Lenzen, S. (1997). Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J Endocrinol*, 155(2), 283-293.
  20. Kumar, S., Kumar, V., Prakash, O. (2011). Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Dillenia indica* (L.) leaves extract on alloxan induced diabetic rats. *APJ TM*, 4(5), 347-352.
  21. Kumar, S., Sai Sailesh, P. (2014). A comparative study of the anti diabetic effect of oral administration of cinnamon, nutmeg and peppermint in wistar albino rats. *IJHSR*, 4(2), 61-67.
  22. Meliani, N., El Amin Dib, M., Allali, H., Tabti, B. (2011). Hypoglycaemic effect of *Berberis vulgaris* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *APJTB*, 1(16), 468-471.
  23. Nickavar, B., Alinaghi, A., Kamalinejad, M. (2010). Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iran J Pharm Res*, 7(3), 203-209.
  24. Peschke, E., Ebel, H., Brömme, H. J., Peschke, D (2000). Classical and new diabetogens-comparison of their effects on isolated rat pancreatic islets in vitro. *CMLS*, 57(1), 158-164.
  25. Peyrat-Maillard, M. N., Bonnely, S., Berset, C. (2000). Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. *Talanta*, 51(4), 709-716.
  26. Saldeen, J. (2000). Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common bcl-2 inhibitable pathway in rat insulin-producing cells, *Endocrinology*, 141(6), 2003-2010.
  27. Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K., Kato, Y., Osawa, T., Yoshikawa, T. (2003). Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med*, 34(8), 1060-1070.
  28. Shetty, k. (2001). Biosynthesis and medical ap-



- plications of rosmarinic acid. J Herbs Spices Med Plants, 8(2), 161-181.
29. Singh, J., Kakkar, P. (2009). Antihyperglycemic and antioxidant effect of *Berberis aristata* root extract and its role in regulating carbohydrate metabolism in diabetic rats. J Ethnopharmacol, 123(1), 22-26.
30. Song, T., Lee, S. O. (2003). Soy protein with or without isoflavones, soy germ and soy germ extract, and daidzein lessen cholesterol levels in golden Syrian hamsters. Exp Biol Med, 228(9), 1063-1068.
31. Sunil, C., Latha, P. G., Suja, S. R., Shine, V. J., Shyamal, S., Anuja G. I., Sini, S., Rajasekharan, S., Agastian, P., Ignacimuthu, S., Kalichelvan, V. (2009). Effect of ethanolic extract of *Pisonia alba* span leaves on blood glucose levels and histological. IJARNP, 2(2), 4-11.
32. Tang, L. Q., Wei, W., Chen, L. M., Liu, S. (2006). Effects of berberine on diabetes induced by alloxan and a high-fat/high-cholesterol diet in rats. J Ethnopharmacol, 108(1), 109-115.





## Evaluation of Pancreatic Histopathological Changes Due to Administration of *Mentha spicata* Extract in Alloxan-Induced Diabetic Rats

Sonia Sahvieh<sup>1</sup>, Abbas Javaheri Vayeghan<sup>2</sup>, Mahmood Ahmadi Hamedani<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduated From the Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

<sup>2</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

<sup>3</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

(Received 17 April 2018, Accepted 4 July 2018)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Due to the globally increasing diabetes and widespread side effects after using the synthetic drugs, a lot of researches are being undertaken in order to replace chemicals with natural substances with similar biological effects.

**OBJECTIVES:** The aim of this study was to compare pancreatic histopathological changes between Glibenclamide and *Mentha spicata* extract consumed in diabetic Wistar rats.

**METHODS:** 24 male Wistar rats were randomly divided to four groups (six rats per group) including healthy group (negative control), diabetics (positive control). Group 2 included diabetic rats treated with 2mg/kg Glibenclamide (standard anti-diabetic drug), Group 3 were diabetic rats treated with 300mg/kg aqueous extract of mentha spicata. Group 4 included positive control. Diabetes was induced through intraperitoneal injection (150mg/kg) in groups 2,3 and 4. All treatments were carried out daily by gavage for 21 days. After the treatment period, and euthanizing rats, pancreatic tissues were fixed and prepared for staining with H & E and Gomori methods to differentiate  $\alpha$  and  $\beta$  cells and other changes of Langerhans islets. Average area of islets and (total islets area/total pancreas) was calculated. Total cells average count per mm<sup>2</sup> of islets and beta cells density were examined in random selected microscopic fields. Changes in shape of cells and their nuclei were considered. Data were analyzed by ANOVA and Tukey test in SPSS software.

**RESULTS:** The results showed that alloxan can induce severe damage on beta cells and Glibenclamide and aqueous extracts of *Mentha spicata* can be taken to prevent further destruction of these cells. Statistical results showed that although Glibenclamide has effects but there is no significant difference between aqueous extracts of *Mentha spicata* and Glibenclamide in their effects on the pancreas islets of diabetic rats.

**CONCLUSIONS:** Because the aqueous extract of *Mentha spicata* has strong antioxidant properties, It may prevent the damaging effects of free radicals on the beta cells of Langerhans islets. As a result, due to side effects of chemical drugs, compared to the use of this extract, it can be more useful and prevent further destruction of pancreatic beta cells rather than chemical drugs used in diabetics.

### Keyword:

Alloxan, *Mentha spicata*, Beta cells, Pancreases, Glibenclamide

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Effects of mentha spicata extract and glybenclamide on blood glucose of rats is compared in different groups.

**Table 2.** Ratio of  $\beta$  cells to total cells, density of  $\beta$  cells and total cells in each mm<sup>2</sup> and ratio of islets to pancreas area is compared in different groups.

**Figure 1.** Pancreases, Negative control, a large and a small healthy islet are visible. H&E. Mag×100.

**Figure 2.** Diabetic pancreas, small islets and increased distances between lobules are visible. H&E. Mag×100.

**Figure 3.** Pancreas of diabetic rat treated with glybenclamide. More density of cells compared with control group is visible. H&E. Mag×100.

**Figure 4.** Pancreas of diabetic rat treated with menta spicata. Variety in size of islets is significant. H&E. Mag×100.

**Figure 5.** Pancreas, Negative control, red stained nuclei belonged to  $\alpha$  cells. Gomory staining. Mag×100.

**Figure 6.** The pancreas of diabetic rats, decreased cell population and the increased nuclei density are visible on the islands that could be caused by apoptosis. H&E. Mag×400.

**Figure 7.** The blank round spaces seen in pancreatic tissue (arrows tip). H&E. Mag×400.

