

آیا مصرف شبدر (*Trifolium pratense* L.) می تواند از ایجاد و توسعه رگه های چربی در عروق کرونر پیش گیری کند؟

صدیقه عسگری^{۱*}، جمال مشتاقیان^۲، غلامعلی نادری^۳، زهرا فتاحی^۴، محسن حسینی^۵، غلامرضا دشتی^۶، شهریار ادیبی^۷

- ۱- دانشیار، گروه فارماکونوزی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
 - ۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
 - ۳- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان
 - ۴- دکترای تخصصی کلینیکال پاتولوژی، بیمارستان فیض، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
 - ۵- کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اصفهان
 - ۶- پزشک، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
 - ۷- دامپزشک، مسؤول لانه حیوانات مرکز تحقیقات پروفیسور ترابی نژاد، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
- *آدرس مکاتبه: اصفهان، میدان جمهوری اسلامی، خیابان خرم، مرکز درمانی تحقیقاتی صدیقه طاهره (س)، صندوق پستی: ۱۱۴۸-۸۱۴۶۵، تلفن: ۳۳۵۹۶۹۶، ۳۳۵۹۷۹۷ (۰۳۱۱)، نمابر: ۳۳۷۳۴۳۵ (۰۳۱۱)
پست الکترونیک: S_asgari@crc.mui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۴/۹/۱۵

تاریخ تصویب: ۸۵/۱۰/۲۰

چکیده

مقدمه: فیتواستروژن ها ترکیباتی طبیعی هستند که در بسیاری از گیاهان یافت می شوند و دارای خصوصیت آنتی اکسیدانی و استروژنیک هستند. شبدر متعلق به خانواده لگومینوز حاوی مقادیر زیادی فیتواستروژن است.
هدف: هدف از این تحقیق تاثیر مصرف این گیاه در حیوانات بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و نیز ایجاد و توسعه رگه های چربی بوده است.

روش بررسی: این بررسی بر روی ۲۰ خرگوش نر بالغ که به طور تصادفی در چهار گروه پنج تایی تقسیم بندی شده بودند، انجام گرفته است. خرگوش های مورد بررسی رژیم پایه، رژیم پایه همراه با شبدر، رژیم پرکلسترول، رژیم پرکلسترول همراه با شبدر دریافت کردند. در ابتدا و دو ماه بعد از شروع بررسی از حیوانات نمونه خون گرفته شد و در انتهای تحقیق نیز آنورت و کرونر راست و چپ از نظر وجود و میزان رگه های چربی ارزیابی گشت.

نتایج: استفاده از شبدر همراه با رژیم پرکلسترول در مقایسه با رژیم پرکلسترول به تنهایی به طور معنی دار (C-Reactive Protein) CRP، تری گلیسرید، توتال کلسترول و LDL کلسترول را کاهش و HDL کلسترول را افزایش داده است (p< ۰/۰۵). همچنین میانگین رگه های چربی در آنورت، کرونر راست و چپ به طور معنی دار کمتر بود (p< ۰/۰۵).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از بررسی نشان می دهد مصرف شبدر می تواند از ایجاد و توسعه آترواسکلروز پیش گیری کند.
گل واژگان: Red clover، Trifolium، فیتواستروژن، رگه چربی، شبدر



مقدمه

فیتواستروژن‌ها ترکیباتی طبیعی هستند که در بیشتر غذاها یافت می‌شوند و دارای ساختمان و عمل مشابه استرادیول هستند [۱]. عمل حفاظتی فیتواستروژن‌ها بر سیستم قلبی - عروقی تایید شده است. شواهدی نیز مبنی بر تاثیر حفاظتی فیتواستروژن‌ها بر این سیستم وجود دارد. چنانچه بررسی‌های اپیدمیولوژیک بیانگر کاهش شیوع بیماری‌های عروق کرونر در افرادی می‌باشد که مصرف فیتواستروژن‌ها در آن‌ها زیاد بوده است [۲،۳]. می‌توان اهمیت توجه به گیاهان حاوی فیتواستروژن را درک کرد.

شبدر^۱ گیاهی از خانواده نخود^۲ است، و عصاره‌های مختلف آن در اروپا و سایر کشورها به عنوان مکمل غذایی استفاده می‌شود؛ چون حاوی مقادیر زیاد ترکیبات ایزوفلاون است که این مواد خصوصیت استروژنی داشته و برای سلامتی مفید هستند [۴،۵،۶]. بنابراین بررسی حاضر به منظور ارزیابی اثرات شبدر بر ایجاد و توسعه رگه‌های چربی^۳ در حیوانات آزمایشگاهی طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

در ابتدا گیاه شبدر از سمیرم اصفهان جمع‌آوری گردید و توسط دکتر محمد رضا رحیمی نژاد، گیاه‌شناس و عضو هیات علمی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان شناسایی علمی شد. خرگوش‌های نر سفید بالغ با میانگین وزنی ۲/۵ - ۲ کیلوگرم و سن تقریبی ۱۰ هفته از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. در ابتدا و انتهای بررسی میانگین وزنی خرگوش‌ها در هر گروه تعیین شد.

بعد از این که تمامی خرگوش‌ها به مدت دو هفته تحت رژیم پایه Super fasskorn standard rabbit chow قرار گرفتند، در ابتدا از تمامی آن‌ها جهت انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی خون‌گیری انجام گرفت و سپس به صورت تصادفی در چهار گروه پنج‌تایی تقسیم شدند. به گونه‌ای که گروه اول رژیم پایه، گروه دوم رژیم پرکلسترول (۱ درصد)،

گروه سوم رژیم پایه همراه با شبدر و گروه چهارم رژیم پرکلسترول همراه با شبدر دریافت کردند. در گروه‌های سوم و چهارم ۸ درصد رژیم غذایی روزانه خرگوش، پودر خشک شده شبدر بوده است. جهت تهیه رژیم پرکلسترول، کلسترول تهیه شده از کارخانه مرک آلمان بر مبنای ۱ درصد وزن به غذای روزانه خرگوش‌ها اضافه شد.

محدودیت مصرف آب برای خرگوش‌ها وجود نداشت. بعد از ۱۲ هفته خرگوش‌ها توسط محلول پتوباریتال ۵ درصد بیهوش شده و پس از جمع‌آوری نمونه لخته و پلاسما آنورت، کرونر راست و کرونر چپ جدا و در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد و پس از تهیه نمونه، آزمایش‌های میکروسکوپی جهت ارزیابی و تعیین مقدار Fatty Streak بر اساس درجه‌بندی از صفر تا ۴ انجام گردید [۷]. وجود سطح صاف عاری از هر گونه ضایعه درجه صفر؛ وجود رگه‌های چربی و نقطه‌های چربی به میزان کم، درجه یک؛ وجود رگه‌ها و نقطه‌های چربی به میزان متوسط، درجه دو؛ وجود رگه‌ها و نقطه‌های چربی به میزان زیاد، درجه سه؛ وجود رگه‌ها و نقطه‌های چربی در قسمت اعظم عروق، درجه چهار. نمونه‌ها با ذکر کدهای مربوطه به پاتولوژیست تحویل داده شد. و البته هیچ اطلاعاتی در مورد گروه‌های مربوطه در اختیار پاتولوژیست قرار نگرفت.

مقادیر کلسترول تام، HDL - کلسترول، LDL - کلسترول، تری‌گلیسرید، CRP و قندخون ناشتا توسط روش کدورت‌سنجی و با دستگاه اتوآنالایزر هیتاچی و با استفاده از کیت‌های پارس آزمون در آزمایشگاه مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان انجام شده است.

آنالیز آماری

تمامی نتایج حاصل به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است. یافته‌های آزمایشگاهی با آنالیز آماری t-test آزمون شد. یافته‌های مربوط به رگه‌های چربی و همچنین وزن کلیه و کبد توسط آزمون آماری ANOVA انجام گرفت. $p < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

آنالیزهای آماری توسط نرم‌افزار SAS بررسی شده است.

¹ *Trifolium pratense* L.

² Legume

³ Fatty Streak



نتایج

اثرات مصرف شبدر بر رگه‌های چربی در جدول شماره ۲ و تصویر شماره ۱ آمده است. تشکیل رگه‌های چربی در آئورت، کرونر راست و چپ در خرگوش‌های مصرف‌کننده رژیم پرکلسترول به همراه شبدر در مقایسه با گروه تحت رژیم پرکلسترول به طور معنی‌دار کاهش یافته است. همچنین استفاده از شبدر در گروه معمولی موجب کاهش معنی‌دار رگه‌های چربی در کرونر راست نسبت به رژیم معمولی شده است. مصرف شبدر همراه با رژیم پرکلسترول به طور معنی‌دار موجب کاهش وزن کبد و کلیه شده است (جدول شماره ۲).

نتایج حاصل هیچ‌گونه تفاوت آماری معنی‌داری را بین میانگین وزن ابتدا و انتهای بررسی در گروه‌های مورد بررسی نشان نداد.

اثرات مصرف شبدر بر فاکتورهای بیوشیمیایی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. استفاده از شبدر در گروه مصرف‌کننده رژیم پرکلسترول به طور معنی‌دار موجب کاهش میزان CRP، توتال کلسترول، تری‌گلیسرید و LDL کلسترول و افزایش معنی‌دار HDL کلسترول در مقایسه با گروه مصرف‌کننده رژیم پرکلسترول به تنهایی شده است.

جدول شماره ۱ - مقایسه تغییرات میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی در گروه‌های مختلف مورد بررسی

فاکتورهای بیوشیمیایی mg/dl	رژیم پرکلسترول/ رژیم پرکلسترول با شبدر	p.value	رژیم معمولی / رژیم معمولی با شبدر	p.value	رژیم پرکلسترول/رژیم معمولی	p.value
FBS	۲۷/۴ ± ۵/۸	۰/۲۳۱	۶/۴ ± ۳/۲	۰/۷۵۷	-۳۱/۶ ± ۴/۳	۰/۱۷۸
CRP	۲/۰۰ ± ۰/۲	۰/۰۲۹*	-۱/۸۰ ± ۰/۳	۶/۰۹۴	-۲/۴ ± ۰/۲	۰/۰۲۹*
HDL	-۳۱/۶ ± ۱۹/۱	۰/۰۱۶۳*	۶/۴ ± ۱/۲	۰/۵۲۴	۷۴/۴ ± ۱۴/۲	۰/۰۰۳*
LDL	۱۷۱/۰ ± ۱۱/۴	۰/۰۰۱*	-۱۳/۶ ± ۹/۸	۰/۶۵۲	-۵۲۲/۰ ± ۱۲/۳	۰/۰۰۰*
TG	۹۶/۰ ± ۱۵/۲	۰/۰۵۲*	-۵۵/۲ ± ۱۲/۳	۰/۴۳۸	-۱۸۷/۸ ± ۷/۶	۰/۰۰۱*
Chol	۱۶۸/۰۰ ± ۸/۷	۰/۰۰۱*	-۶/۶ ± ۱/۶	۰/۵۳۰	-۶۵۰/۸ ± ۱۲/۴	۰/۰۰۰*

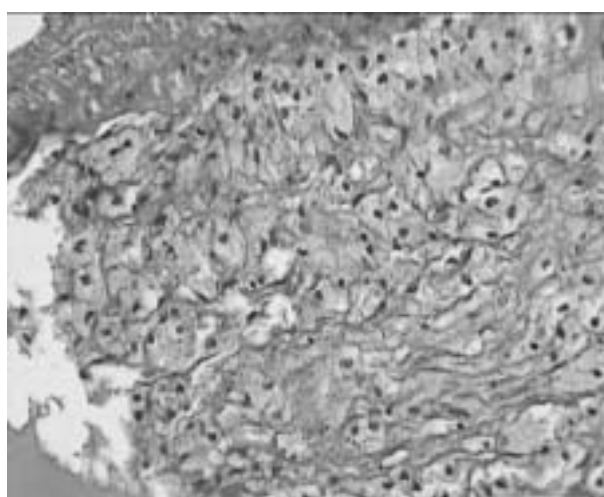
*p<۰/۰۵ معنی‌دار نظر گرفته شده است (t-test)

FBS: قند خون ناشتا؛ CRP: پروتئین C-Reactive؛ HDL: لیپوپروتئین با دانسیته بالا؛ LDL: لیپوپروتئین با دانسیته پایین؛ TG: تری گلیسرید؛ Chol: کلسترول

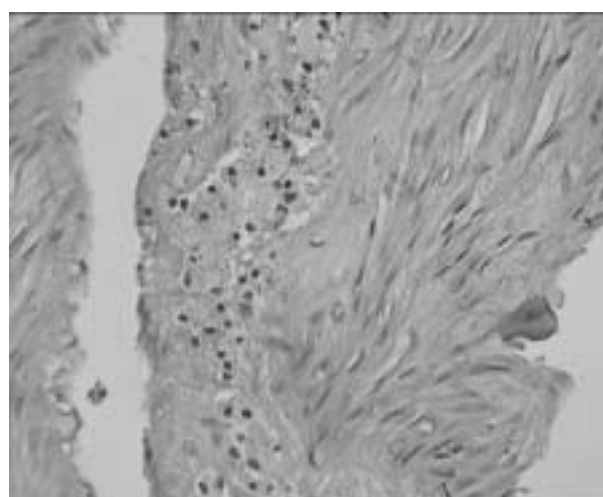


جدول شماره ۲ - میانگین شیوع رگه های چربی در آنورت و کرونر راست و چپ در گروه های مختلف در پایان بررسی

Group/diet	رژیم معمولی	رژیم پرکلسترو	رژیم معمولی با شبدر	رژیم پرکلسترو با شبدر
کرونر راست	میانگین $\pm$ انحراف معیار	$2/2 \pm 1/78^a$	$0/51^b \pm 0/42$	$0/26^b \pm 0/06$
کرونر چپ	میانگین $\pm$ انحراف معیار	$1/54^a \pm 1/33$	$0/0/0/0^b$	$0/0/0/0^b$
آنورت	میانگین $\pm$ انحراف معیار	$1/51^a \pm 1$	$0/0/0/0^b$	$0/62^b \pm 0/33$

a: تفاوت معنی دار در مقایسه با رژیم معمولی ($p < 0/05$)b: تفاوت معنی دار در مقایسه با رژیم پرکلسترو ($p < 0/05$)

(A)



(B)

تصویر شماره ۱- بررسی میکروسکوپی کرونر راست خرگوش های تحت رژیم پرکلسترو (A)، بررسی میکروسکوپی کرونر راست خرگوش های تحت رژیم پرکلسترو همراه با شبدر (B)



بحث

عملکرد عروق ۲۱۰ مرد و زن از نظر آماری معنی‌دار نبوده است [۱]. در هر حال قابل توجه است که ایزوفلاون formononetin در سویا موجود نیست در حالی که در شبدر وجود دارد. اگرچه این ترکیب به دایدزین تبدیل می‌شود، ۲۵ درصد آن به صورت اولیه دفع می‌گردد. به نظر می‌رسد این ایزوفلاون اثر مستقیمی بر روی سیستم عروقی داشته باشد، به‌گونه‌ای که مکمل‌های غذایی حاوی ایزوفلاون‌های شبدر در خانم‌های دیابتی منوپوز، فشار خون را کاهش داده‌اند [۱۸]. نارنجنین در خرگوش‌ها WHHL به طور معنی‌دار موجب افزایش HDL کلسترول و کاهش فعالیت گلوکاتیون ردوکتاز شده‌اند در صورتی‌که تجمع کلسترول را در آئورت کاهش نداده‌اند [۱۹]. اختلال در عملکرد آندوتلیوم موجب افزایش فشارخون، دیس‌لیپیدی، دیابت و منوپوز می‌گردد و عامل خطر مهمی در وقوع وقایع قلبی - عروقی است. به نظر می‌رسد اختلال در عملکرد آندوتلیوم عامل مهم و عمده در پاتوژنز ایجاد آتروما و وقوع حوادث قلبی - عروقی باشد. بنابراین همان‌گونه که بررسی حاضر نشان داده، شبدر با توجه به مواد متشکله آن و تاثیر بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون و جلوگیری از تشکیل رگه‌های چربی می‌تواند گیاه موثری در پیش‌گیری از آترواسکلروز باشد.

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که مصرف شبدر با کاهش تری‌گلیسرید، کلسترول، LDL کلسترول، CRP و افزایش HDL کلسترول، تشکیل رگه‌های چربی را کاهش می‌دهد. شبدر گیاهی از خانواده نخود بوده و با توجه به این‌که مقادیر زیادی ایزوفلاون دارد که خصوصیات استروژنیک دارند، مصرف آن به عنوان مکمل غذایی توصیه شده است.

مصرف فیتواستروژن‌های خالص در کرونر جدا شده از خرگوش موجب ریلاکس^۱ شدن شریان کرونر به صورت وابسته به دوز و با مکانیسم شبیه آنتاگونیسم‌های کلسیم شده است [۸].

بررسی‌های اپیدمیولوژیک نیز کاهش شیوع بیماری‌های قلبی - عروقی در جوامع مصرف‌کننده مقادیر زیاد ایزوفلاون را نشان داده است [۹، ۱۰]. بررسی‌ها و تحقیقات انجام شده بر روی حیوانات و انسان نشان داده‌اند مصرف روزانه سویا که حاوی ایزوفلاون است موجب کاهش فشارخون، بهبود پروفایل لیپیدهای خونی و بهبود در وضعیت عمل عروق خونی شده‌اند [۱۱، ۱۲]. اثرات ایزوفلاون‌های جدا شده بر روی عمل عروق خونی در انسان کمتر نشان داده شده است [۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷]. در دو بررسی مداخله‌ای مشخص گردیده استفاده از ایزوفلاون‌ها موجب بهبود در سختی شریان‌ها شده در صورتی‌که بر وازودیلاتاسیون وابسته به میزان جریان خون^۲ تاثیری نداشته است [۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷].

در مردان با فشارخون نرمال و خانم‌های منوپوز، مصرف شبدر غنی از ایزوفلاون^۳ باعث کاهش سختی شریان‌ها و مقاومت کل عروق شده اما فشارخون در آن‌ها تغییری نکرده است [۹].

همچنین بررسی دیگری نشان داده مصرف ایزوفلاون‌های شبدر به طور مطلوب بر فشارخون و عمل آندوتلیوم در خانم‌های منوپوز دیابتی تاثیر دارد [۱۸].

در یک بررسی کارآزمایی بالینی بزرگ تاثیر مصرف پروتئین سویا حاوی ژنیستین^۴ و دایزین^۵ در بهبودی

^۱ Relax^۳ Formononetin^۵ Daidzein^۲ Flow mediated dilation^۴ Genistein

1. Axelson M, Sjoval J, Gustafsson BE, Stechell KD. Soya-a dietary source of the nonsteroidal oestrogen equol in man and animals. *J. Endocrinol.* 1984; 102: 49-56.
2. Stampfer MJ, Colditz GA. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* 1991; 20: 47-63.
3. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. *N Engl J. Med.* 1991; 325: 756-62.
4. Aldercreutz H, Markkanen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet* 1993; 342: 1209-10.
5. Hertog MG, Kromhont D, Aravanis C. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern. Med.* 1995; 155: 381-6.
6. Howes JB, Sullivan D, Lai N. The effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on the lipoprotein profiles of postmenopausal women with mild to moderate hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2000; 152: 143-7.
7. Howes JB, Waring M, Huang L, Howes LG. Chronic pharmacokinetics of an extract of isoflavone, from red clover. *J. Altern. Complement. Med.* 2002; 8: 135-42.
8. Campbell MJ, Woodside JV, Honour JW, Morton MS, Leathem AJ. Effect of red clover-derived isoflavone supplementation in like growth factors, lipid and antioxidant status in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2004Jan; 58(1): 173-9.
9. Fischer Hansen BA, Mortensen JF, Hansen P, Ibsen H, Frandsen. Atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. Evaluation by microscopic and biochemical methods and comparison of atherosclerosis variables. 1994; *APMIS.* 102: 177-190.
10. Figtree GA, Griffiths BH, Ying-Qing LU, Webb CM, MacLeod K, Collins P. Plant-Derived Estrogens relax coronary arteries *in vitro* by a calcium antagonist mechanism. *Journal of the American College of Cardiology* Vol 35, No 7, 2000. 1977-1985.
11. Helena J, Barry P. Lakmini D, Marja C, Andriana F, Paul JN. Isoflavones Reduce Arterial Stiffness, A placebo controlled study in men and postmenopausal women. *Arterioscler. Throm. Vasc. Biol.* 2003; 1066-1071.
12. Honore EK, Williams JK, Anthony MS, Clarkson TB. Soy isoflavones enhance coronary vascular reactivity in atherosclerotic female macaques. *Fertil Steril.* 1997; 67: 148-154.
13. Nestel PJ, Yamashita T, Sasahara T, Pomeroy S, Dart A, Komesaroff P, Owen A, Abbey M. Soy isoflavones improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal and postmenopausal women. *Arterioscler. Thromh. Vasc. Biol.* 1997; 17: 3392-3398.
14. Nestel PJ, Pomeroy S, Kay S, Komesaroff P, Bebrsing J, Cameron JD, West L. Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 895- 898.
15. Williams JK, Clarkson TB. Dietary soy isoflavones inhibit in-vivo constrictor responses of coronary arteries to collagen-induced platelet activation. *Coron. Artery. Dis.* 1998; 9: 759-764.
16. Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Celermajor DS. Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *Am. J. Cardiol.* 2000; 85: 1297-1301.
17. Squadrito F, Altavilla D, Morabito N, Crisafulli A, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Campo GM, Calapi G, Caputi AP, Squadrito G. The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium



dependent vasodilatation in postmenopausal women. *Artherosclerosis* 2002; 163: 339-347.

18.Howes JB, Tran D, Brillante D, Howes LG. Effects of dietary supplementation with isoflavones from red clover on ambulatory blood pressure and endothelial function in postmenopausal type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Volume 5, issue5, 2003; p.325-332.

19.Mortensen A, Breinholt V, Dalsgaard T, Frandsen H, Lauridsen ST, Laigaard J, Ottesen B, Larsen J. 17 β -Estradiol but not the phyestrogen naringenin attenuates aortic cholesterol

accumulation in WHHL rabbits. *Journal of Lipid Research* 2001; 42: 834-843.

20.Adlercreutz H. Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 12: 605-623.

21.Teede HI, Dalais F, Kotsopoulos D, Liang YL, McGrath BP. Soy protein dietary supplementation containing phytoestrogens improves lipid profiles and blood pressure: a double blind, randomised, placebo controlled study in men and postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 3053-3060.

