مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۲، شماره۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶(شماره پی در پی۱۲۰)

اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر هورمون‌های محور هیپوفیز-گناد و تعداد فولیکول‌های تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی

راهله رهباریان[۱]، سید دامون صدوقی[۲*]، حوریه اسماعیلی سبزوار[۱]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، [۲] باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: اختلالات باروری از مسائل مهم بیماران دیابتی است و از گذشته برای درمان این بیماری از داروهای شیمیایی و گیاهی مختلفی استفاده شده است. با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی و هیپوگلیسمیک گیاه حرا، هدف از این مطالعه تعیین اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر سطح هورمون‌های محور هیپوفیز-گناد و تعداد فولیکول‌های تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به گروه‌های مساوی کنترل، دیابتی تیمار نشده و دو گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ گیاه حرا با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند. دیابت در گروه دیابتی تیمار نشده و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره حرا، به وسیله یک‌بار تزریق داخل صفاقی ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلوکسان القاء شد. عصاره برگ گیاه حرا یک روز در میان و به‌مدت یک ماه به‌صورت داخل صفاقی به گروه‌های دیابتی تحت تیمار تزریق شد. محلول سالین به حیوانات گروه کنترل و دیابتی تیمار نشده، تزریق شد. در پایان دوره تیمار، سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین به وسیله روش الایزا اندازه‌گیری شد. مقاطع ۵ میکرومتری از بافت تخمدان تهیه و به وسیله روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد. سپس تعداد فولیکول‌های تخمدان به وسیله میکروسکوپ نوری بررسی شد. نتایج با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در مقایسه با نمونه‌های گروه کنترل، سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در گروه دیابتی تیمار نشده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۵$). هم‌چنین، تعداد جسم زرد، فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش و تعداد فولیکول آترزی شده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت($p<۰/۰۵$). در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، تجویز عصاره آبی برگ گیاه حرا با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین را به‌طور معنی‌داری افزایش داد($p<۰/۰۵$). هم‌چنین تعداد جسم زرد، فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده به‌طور معنی‌داری افزایش و تعداد فولیکول آترزی شده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر اثر معنی‌دار عصاره برگ گیاه حرا بر افزایش سطح سرمی گنادوتروپین‌ها، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در موش‌های صحرایی دیابتی است. هم‌چنین دارای اثر محافظتی بر بافت تخمدان می‌باشد؛ بنابراین استفاده از گیاه حرا می‌تواند در بهبود اختلالات هورمونی و آسیب بافت تخمدان در بیماران دیابتی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: دیابت، تخمدان، حرا، گنادوتروپین، موش صحرایی

* **نویسنده مسئول: سید دامون صدوقی**، مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان
Email: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

مقدمه

دیابت یک بیماری مزمن بـا علـل چندگانـه اسـت و اشاره به گروهی از اختلالات متابولیک شایع دارد کـه علـت آن قند خـون بـالا، عـدم تولیـد انسـولین کـافی بـه وسـیله پـانکراس و یـا مقاومـت انسـولینی اسـت. عـوارض مـزمن دیابت بسـیاری از انـدام‌هـا و مکانیسـم‌هـای فیزیولوژیـک طبیعی بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهـد. کتواسـیدوز دیـابتی و اسمولاریته بالا، اختلال شـرائین کرونـر، اخـتلال عـروق محیطی و آسیب عروق مغز از جمله عوارض مزمن دیابـت مـی‌باشـد. هـم‌چنـین مـی‌تـوان بـه رتینوپـاتی، نفروپـاتی، بیماری‌های نورولوژیک، بیمـاری‌های قلبـی ـ عروقـی، بیماری‌های پوستی و زخـم در انـدام‌هـای تحتـانی اشـاره کرد. اخـتلال در متابولیسـم کربوهیـدرات‌هـا، چربـی‌هـا و پروتئین‌ها از عوارض شایع دیابت قنـدی مـی‌باشـد کـه بـه دنبـال فقـدان یـا کـاهش چشـمگیر ترشـح انسـولین ایجـاد می‌شود(۱).

اسـترس‌اکسـیداتیو نقـش کلیـدی در بیمـاری دیابت و اختلالات هورمونی ناشی از آن ایفاء مـی‌کنـد. مشخص شده است سطوح بالای گلـوکز مـی‌توانـد بـه تشـکیل گونـه‌هـای اکسـیژن فعـال، افـزایش شـرایط اسـترس اکسیداتیـو و در نتیجـه آسـیب سـلول‌هـا و بافـت‌هـا بینجامـد(۲) بـه طـوری کـه افـزایش پارامترهـای اسـترس اکسـیداتیو در طی دیابت ملیتوس تغییر می‌کند و می‌تواند منجر به اخـتلال در ترشـح هورمـون‌هـای جنسـی در نمونـه‌هـای دیـابتی شود(۳).

علاوه بر عـوارض شـایع دیابـت، مشـخص شـده است دیابت با ایجاد اختلالات متابولیک، متابولیسم عمـومی بدن و غـدد درون‌ریـز را تحـت تـأثیر قـرار مـی‌دهـد و در عملکـرد طبیعـی محورهـای هورمـونی اخـتلال ایجـاد می‌کند(۴). هم‌چنین از دیابت به عنوان یکی از علـل مهـم ناباروری نام برده می‌شود؛ زیرا تحقیق‌ها نشـان داده است دیابت موجب اختلال در عملکرد تخمدان از جمله اختلال در رشـد فولیکـولی،اختلال در بلـوغ اووسـیت، کاهش یا عدم تخمک‌گذاری و تغییر در رفتار استروس می‌شـود(۵). هورمـون‌هـای محـور هیپوفیز ـ تخمـدان در کنترل اعمال تولیدمثلی، تمایز جنسی، بـروز صـفات ثانویـه جنسـی و برخـی از جنبـه‌هـای رفتـاری دخالـت دارنـد. هیپوتالاموس هورمون آزادکننده گنادوتروپین ترشـح می‌کند و با تنظیم عملکرد بخش قدامی هیپوفیز، میزان ترشح هورمون محرک فولیکـولی و هورمـون محـرک لوتئینی را تعدیل می‌کند. این هورمون‌ها در جنس ماده موجـب فعـال‌سـازی تخمـدان‌هـا در جهـت تولیـد پروژسترون، استروژن و اینهیبین و نیز موجب تنظیم قاعدگی و سیکل تخمدانی می‌شود(۶). مشـخص شـده است عملکرد استروژن و پروژسـترون تنظـیم سـیکل قاعـدگی، تنظـیم بـارداری، شـیردهی و میـل جنسـی، آماده‌سازی رحم جهت لانه‌گزینی در زمان لقاح، حفـظ دیواره رحم در طول بارداری و تحریک و توسعه غدد پستانی می‌باشد. بنـابراین هرگونـه اخـتلال در تنظـیم محورهای هورمونی و نیز اخـتلال در سـنتز و ترشـح هورمون‌های جنسـی مـی‌توانـد موجـب اختلالاتـی در

سیستم تولید مثلی و ناباروری شود(۷). در بیماران دیابتی کاهش در سطح سرمی این هورمون‌ها گزارش شده است. هم‌چنین اختلال فعالیت عملکردی سیستم تولیدمثلی در نمونه‌های دیابتی محدود به محور هیپونالاموس ـ هیپوفیز نمی‌باشد و اختلال در عملکرد تخمدان‌ها و عدم تخمک‌گذاری را شامل می‌شود(۸).

طی تحقیق‌های انجام شده گزارش شده است پالپ هندوانه ابوجهل به‌عنوان یک گیاه دارویی، با کاهش قند خون موش‌های صحرایی نر دیابتی سبب افزایش سطح سرمی گنادوتروپین‌ها و افزایش ترشح هورمون تستوسترون می‌شود(۹). پژوهش دیگری نشان داده است کورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی، با کاهش قند خون فعالیت محور هورمونی هیپوفیز بیضه را در موش‌های صحرایی نر دیابتی افزایش می‌دهد(۱۰). گزارش شده است تجویز کورکومین به موش‌های صحرایی دیابتی با کاهش قند خون و کاهش شرایط استرس‌اکسیداتیو، سطح سرمی هورمون محرک فولیکولی و هورمون محرک لوتئینی، استروژن و پروژسترون را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد(۱۱). هم‌چنین مشخص شده است متفورمین با کاهش قند خون سبب بهبود تخمک‌گذاری در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود (۱۲).

در حال حاضر درمان اصلی و مؤثر برای دیابت قندی استفاده از انسولین و داروهای کاهش دهنده قند خون است. اما این ترکیب‌ها دارای اثرات نامطلوب متعدد مانند افزایش ذخایر چربی در محل تزریق و بروز شوک هیپوگلیسمیک بوده و در طولانی مدت بر روند ایجاد عارضه‌های ناتوان کننده دیابت تأثیر زیادی ندارد(۱). بنابراین نیاز جهت یافتن ترکیب‌های مؤثر در درمان دیابت با عوارض جانبی کمتر احساس می‌شود. گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh از خانواده Avicenniaceae یکی از اعضاء گیاهان مانگرو می‌باشد. این گیاه به صورت بوته‌ای یا درختچه‌ای با ارتفاع متغیر بین ۱ تا ۱۰ متر یافت می‌شود. پوسته این گیاه به رنگ سفید، خاکستری یا سبز مایل به زرد می‌باشد. برگ‌ها معمولاً به شکل بیضی یا نوک تیز بوده، در قسمت رویی حالت چرمی و به رنگ سبز روشن و در قسمت‌های زیرین به رنگ سفید مایل به خاکستری و پرزدار است. گیاهان حرا مجموعه‌ای از گیاهان شورپسند و مقاوم به نمک دریا بوده و در قالب جنگل‌های جزر و مدی در امتداد سواحل شرقی آفریقا، جنوب، جنوب شرقی و جنوب غربی آسیا، استرالیا و در حاشیه خلیج فارس در جزیره قشم، بندر خمیر، بندر گواتر، بندر دیر و خلیج نایبند پراکندگی دارند(۱۳). این گونه دارای ترکیب‌های زیستی فعالی بوده و دارای فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی می‌باشد. هم‌چنین گیاه حرا غنی از انواع فیتوالکسین‌ها، استروئیدها، اسیدهای کربوکسیلیک، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و تری‌ترپن‌ها می‌باشد(۱۴). فلاونوئیدها بزرگترین گروه از پلی‌فنول‌ها می‌باشند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند و بر اساس

ساختار مولکولی شامل گروه‌های مختلفی از آنتوسیانین‌ها هستند. هم‌چنین مشخص شده است که مصرف گیاهان غنی از ترکیب‌های پلی‌فنول می‌تواند سطح آنتی‌اکسیدان‌ها را در خون افزایش دهد(۱۵). در طب سنتی از گیاه حرا جهت تسکین درد استفاده می‌شود. هم‌چنین مشخص شده است دارای اثرات سایتوتوکسیک، ضد سرطانی و ضد توموری می‌باشد (۱۶). مطالعه‌ها نشان داد تجویز برگ گیاه حرا به موش‌های صحرایی موجب کاهش سطح سرمی گلوکز شد (۱۵). در پژوهشی دیگر مشخص شد فلاونوئیدهای گیاه حرا از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند(۱۷ و۱۵). گزارش شده است عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا دارای اثرات ضد دردی می‌باشد و این اثرات به فلاونوئید و تانن موجود در آن نسبت داده شد(۱۸). تحقیق‌ها نشان می‌دهد ترکیب‌های برگ گیاه حرا دارای خواص ضدالتهابی است و می‌تواند موجب بهبود آرتریت در موش‌های صحرایی شود(۱۹).

با توجه به وجود ترکیب‌های بیولوژیکی فعال در گیاه حرا و به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و هیپوگلیسمیک آن، هدف از این مطالعه تعیین اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر سطح سرمی هورمون‌های LH و FSH، استروژن، پروژسترون، پرولاکتین و تعداد فولیکول‌های تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی آزمایشگاهی بر روی ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار انجام شد. پژوهش حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد در بهار سال ۱۳۹۵ انجام شد. تمام مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور طراحی و اجرا شد.

حیوانات با وزن تقریبی ۱۸۰ــ۱۷۰ گرم از مرکز تکثیر و نگهداری دانشگاه پیام نور مرکز مشهد تهیه و در دمای تقریبی ۲۲ــ۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۰-۳۵ درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (شرکت رازی راد، ایران) قرار داشتند و آب به مقدار کافی به وسیله بطری پلاستیکی در اختیار آن‌ها قرار داده شد و از غذای فشرده مخصوص موش آزمایشگاهی با فرمولاسیون استاندارد (شرکت دانه‌داران توس، ایران) تغذیه نمودند. به‌منظور حصول حالت سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات به انجام رسید(۲۰).

برگ درخت حرا از سواحل شمالی جزیره قشم جمع‌آوری شد. سپس به وسیله بخش هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه پیام نور مرکز مشهد مورد شناسایی و تأیید قرار گرفت. برگ گیاه حرا پس از طی

مراحل خشک شدن در سایه در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد، به وسیله آسیاب خرد و عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد. ابتدا ۵۰ گرم پودر خشک شده برگ گیاه حرا داخل کاغذ کارتوش ریخته شد و در محل تعبیه شده دستگاه سوکسله قرار گرفت؛ سپس ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به‌عنوان حلال در داخل بالن دستگاه ریخته شد. آب مقطر به وسیله گرم‌کن دستگاه به جوش می‌آید و در نهایت موجب جداسازی عصاره برگ گیاه حرا می‌شود. پس از حدود ۱۰ ساعت مایع نسبتاً غلیظی در ته بالن جمع شد. سپس با حذف حلال در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره تام استخراج شد(۲۱). لازم به ذکر است قبل از شروع پژوهش LD50 (متوسط دوز کشنده) و ED50 (متوسط دوز مؤثر) عصاره آبی برگ گیاه حرا مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم LD50 و محدوده بین ۳۰۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ED50 می‌باشد. به همین دلیل غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان غلظت‌های درمانی انتخاب شده است.

موش‌های صحرایی به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. شامل؛ گروه کنترل، گروه دیابتی تیمار نشده و دو گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ گیاه حرا. حیوانات گروه کنترل و گروه دیابتی تیمار نشده به مدت یک ماه به‌صورت یک روز درمیان به روش داخل صفاقی محلول سالین(شرکت داروسازی ثامن، ایران) دریافت کردند. این عمل به‌منظور یکسان نمودن شوک حاصل از تزریق انجام گرفت. حیوانات گروه‌های دیابتی تحت تیمار به‌مدت یک ماه و یک روز درمیان عصاره آبی برگ گیاه حرا را به‌صورت داخل صفاقی با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند.

در این پژوهش جهت هم‌سیکل نمودن موش‌های صحرایی ماده از ۵۵۰ میکروگرم استرادیول والرات(داروسازی ابوریحان، ایران) و ۳ میلی‌گرم پروژسترون(داروسازی عبیدی، ایران) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت تزریق عضلانی استفاده شد. پس از ۳۶ ساعت، جهت تعیین منظم بودن سیکل استروس از اسمیر واژینال استفاده شد. ابتدا ۰/۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به وسیله سمپلر (Biopette, UK) به آرامی در واژن حیوان تزریق و سپس یک تا دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر تهیه شد. نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus CX21FS1, Japan) با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر بررسی شد. سیکل استروس موش‌های ماده ۴ روز زمان می‌برد و دارای مراحل پرواستروس، استروس، متاستروس و دی استروس می‌باشد و هر مرحله با نسبت خاص سلول-های شاخی، اپی‌تلیالی با هسته، اپی‌تلیالی بدون هسته و لوکوسیت‌ها مشخص می‌شود. موش‌هایی که در مرحله استروس سیکل تولید مثلی قرار داشتند برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. اسمیر واژن در این مرحله از سیکل دارای سلول‌های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول‌های اپی‌تلیال بوده و فاقد لوکوسیت

می باشد(۲۲). لازم به ذکر است که توسط این روش از بین ۵۵ سر موش صحرایی ماده ۳۲ سر انتخاب شد.

مدل تجربی دیابت در موش‌های صحرایی با یک بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات (Sigma-Aldrich، آلمان) به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایجاد شد. هم‌چنین از بافر سیترات(pH= ۵/۴) به عنوان حلال آلوکسان استفاده شد. آلوکسان به گروه دیابتی تیمار نشده و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ گیاه حرا تزریق شد. مطالعه بر روی دیابت مزمن می‌باشد، به همین دلیل حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان و القاء دیابت تجربی، جهت تأیید آن از ورید دمی خون‌گیری صورت گرفت و قندخون به وسیله دستگاه گلوکومتر(EasyGluco, Korea) اندازه‌گیری شد. قندخون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد(۲۱ و ۲۰، ۱۱، ۱۰).

در پایان دوره درمان دارویی و به دنبال ۱۲ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با دی‌اتیل اتر (Merck, Germany) بی‌هوش شدند. سپس پوست ناحیه قفسه سینه، جناغ و دنده‌ها برش داده شد و با کنار کشیدن جناغ و دنده‌ها از بطن چپ قلب به وسیله سرنگ ۲ میلی‌لیتر خون‌گیری انجام شد. خون گرفته شده بدون ماده ضد انعقاد درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱۲ دقیقه در انکوباتور (Memmert UNB 400, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

بعد از وقوع انعقاد، لوله‌ها در دستگاه سانتریفیوژ(Hettich, Germany) به مدت ۱۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس سرم خون روی بخش لخته شده به وسیله سمپلر جدا و به لوله آزمایش دیگری منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۲۰). سطح سرمی هورمون-های LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین به وسیله کیت‌های مخصوص موش صحرایی (Finetest, China) به روش ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) با استفاده از دستگاه ELISA reader(Stat Fax 2100, USA) اندازه‌گیری شد. سنجش شاخص‌های هورمونی در هر گروه دو مرتبه تکرار و میانگین آن در تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد.

جهت بررسی بافتی ابتدا تخمدان‌ها از حفره شکمی خارج و با محلول سرم فیزیولوژی شستشو شدند. سپس در فرمالدئید ۱۰ درصد (Merck, Germany) قرار گرفتند. پس از تثبیت نمونه‌های بافتی، مراحل آب-گیری، شفاف‌سازی و قالب‌گیری طی شد و مقاطع ۵ میکرونی تهیه و به روش هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شد(۲۱).

تعداد جسم زرد، فولیکول آترزی شده و تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف با استفاده از میکروسکوپ نوری و فرمول F=(A×B/C)D شمارش شد (F= تعداد کل فولیکول، A= تعداد هر نوع فولیکول در هر برش تخمدان، B= فاصله بین برش‌های شمارش شده، C= قطر اووسیت، D= ضخامت برش‌ها). در این

پژوهش از هر ۱۰ برش یک برش جهت شمارش فولیکول‌ها انتخاب شد، ضخامت برش‌ها ۷ میکرون و قطر اووسیت با استفاده از عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شد(۲۳). لازم به ذکر است که محقق ارزیابی کننده نسبت به گروه‌ها بی‌اطلاع بوده و میانگین اعداد در ۴ مرتبه تکرار شمارش فولیکولی ملاک نتایج تحقیق قرار گرفته است.

اطلاعات به‌دست آمده به وسیله نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون‌های آماری کولموگروف اسمیرنوف، آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تحلیل داده‌های این مطالعه نشان داد سطح سرمی LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در گروه دیابتی تیمار نشده در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۰۱$). هم‌چنین در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، سطح سرمی LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در گروه‌های دیابتی تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت($p<۰/۰۰۲$). سطح سرمی LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت($p<۰/۰۰۸$) که نشان دهنده اثر بیشتر غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا می‌باشد(جدول ۱).

با توجه به نتایج به‌دست آمده تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه، گراف و جسم زرد در گروه دیابتی تیمار نشده در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش($p<۰/۰۱۸$) و تعداد فولیکول-های آترزی شده به‌طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۲۱$). در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه، گراف و جسم زرد در گروه‌های دیابتی تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا به‌طور معنی‌داری افزایش($p<۰/۰۱۷$) و تعداد فولیکول‌های آترزی شده به طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۲۰$). تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه، گراف و جسم زرد در گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌طور معنی‌داری افزایش($p<۰/۰۱۹$) و تعداد فولیکول‌های آترزی شده به طور معنی‌داری کاهش یافت($p<۰/۰۲۲$) که نشان دهنده اثر بیشتر غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا می‌باشد(جدول ۲).

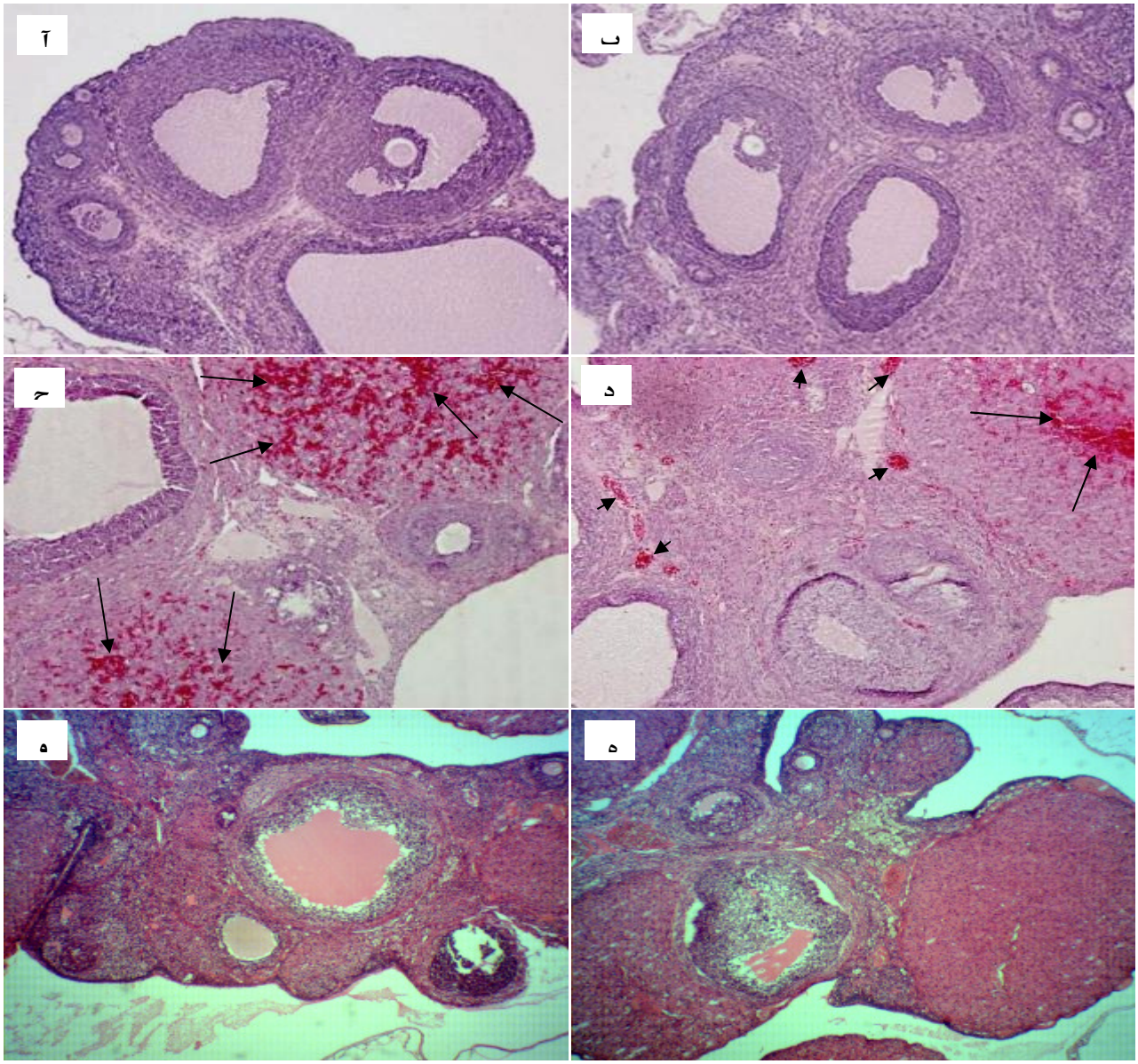
در مقاطع بافتی گروه کنترل(تصویر ۱: الف و ب) آسیب بافت تخمدان مشاهده نمی‌شود و دستجات مختلف فولیکولی قابل مشاهده است. در مقاطع بافتی گروه دیابتی تیمار نشده (تصویر ۱: ج ود) فلش بزرگ نشان دهنده خونریزی در اطراف سلول‌های بینابینی است. هم‌چنین فلش کوچک نشان دهنده التهاب و احتقاق در بافت تخمدان است. در مقاطع بافتی گروه دیابتی تیمار شده با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی گیاه حرا(تصویر ۱: هـ و و) آسیب بافتی به حداقل رسیده است و تکوین دستجات فولیکولی بهبود یافته است(تصویر ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین مقادیر سطح سرمی هورمون‌های اندازه‌گیری شده به تفکیک گروه‌ها به‌صورت Mean±SEM نشان داده شده است؛ a: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل، b: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، c: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره حرا

هر گروه ۸ سر/ پارامتر	LH (میلی واحد بین الملل بر میلی‌لیتر)	FSH (میلی واحد بین الملل بر میلی‌لیتر)	استروژن (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)	پروژسترون (پیکومول بر میلی‌لیتر)	پرولاکتین (نانوگرم بر میلی‌لیتر)
کنترل	۰/۴۲±۰/۰۷	۰/۵۸±۰/۱۴	۱۳۸/۲۵±۱۱/۱۸	۶۹/۲۳±۵/۳۶	۸/۲۳±۱/۷۵
دیابتی تیمار نشده	^{a}۰/۱۲±۰/۰۳	^{a}۰/۲۳±۰/۰۹	^{a}۴۸/۰۰±۹/۳۰	^{a}۲۸/۴۳±۳/۵۰	^{a}۲/۱۰±۰/۵۱
دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم حرا	^{b}۰/۲۰±۰/۰۷	^{b}۰/۳۱±۰/۱۱	^{b}۷۰/۵۴±۶/۴۵	^{b}۴۲/۰۰±۶/۳۷	^{b}۴/۱۹±۰/۸۸
دیابتی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم حرا	^{bc}۰/۳۱±۰/۰۹	^{bc}۰/۴۲±۰/۰۸	^{bc}۱۰۳/۰۵±۱۲/۴۰	^{bc}۵۴/۱۱±۳/۰۶	^{bc}۶/۷۳±۱/۲۵
سطح معنی‌داری	۰/۰۰۹	۰/۰۱۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۲

جدول ۲: مقایسه میانگین تعداد دستجات فولیکولی، جسم زرد و تعداد فولیکول‌های آترزی شده به تفکیک گروه داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف‌معیار نشان داده شده است؛ a: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل، b: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، c: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره حرا

هر گروه ۸ سر/ پارامتر	فولیکول بدوی	فولیکول اولیه	فولیکول ثانویه	فولیکول گراف	جسم زرد	فولیکول آترزی شده
کنترل	۵/۵۰±۱/۵۰	۶/۰۰±۱/۵۰	۳/۵۰±۱/۰۰	۴/۵۰±۱/۵۰	۵/۵۰±۱/۰۰	۱/۵۰±۰/۵۰
دیابتی تیمار نشده	^{a}۱/۵۰±۰/۵۰	^{a}۲/۵۰±۰/۵۰	^{a}۱/۵۰±۰/۵۰	^{a}۱/۰۰±۰/۵۰	^{a}۲/۰۰±۰/۵۰	^{a}۶/۵۰±۱/۰۰
دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم حرا	^{b}۳/۰۰±۱/۰۰	^{b}۴/۵۰±۰/۵۰	^{b}۲/۰۰±۱/۰۰	^{b}۲/۰۰±۰/۵۰	^{b}۳/۵۰±۱/۰۰	^{b}۴/۰۰±۱/۰۰
دیابتی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم حرا	^{bc}۴/۵۰±۱/۵۰	^{bc}۵/۵۰±۰/۵۰	^{bc}۳/۰۰±۰/۵۰	^{bc}۳/۵۰±۱/۰۰	۴/۵۰±۱/۵۰ bc	^{bc}۲/۰۰±۰/۵۰
سطح معنی‌داری	۰/۰۲۰	۰/۰۳۵	۰/۰۳۰	۰/۰۲۵	۰/۰۱۵	۰/۰۱۸



تصویر ۱: فتومیکروگراف از بافت تخمدان (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین، بزرگنمایی ۴۰ برابر)

مقطع بافت تخمدان در گروه کنترل (الف و ب)، مقطع بافت تخمدان در گروه دیابتی تیمار نشده (ج و د)، مقطع بافت تخمدان در گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی گیاه حرا (و)، مقطع بافت تخمدان در گروه دیابتی تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی گیاه حرا (هـ

بحث

این مطالعه به بررسی اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر سطح سرمی هورمون‌های LH و FSH، استروژن، پروژسترون، پرولاکتین و تعداد فولیکول های تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی پرداخت.

با توجه به نتایج به‌دست آمده سطح سرمی هورمون-های LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در گروه دیابتی تیمار نشده در مقایسه با نمونه‌های گروه

کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین تعداد جسم زرد، فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش و فولیکول آترزی شده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. هم‌سو با نتایج این مطالعه، تحقیق‌های جونز و همکاران نشان دادند، دیابت منجر به کاهش سطح سرمی هورمون‌های گنادوتروپین می‌شود(۲۴). کوندر و همکاران نشان دادند دیابت مزمن با کاهش فعالیت سلول‌های تک تخمدانی، سنتز و ترشح هورمون‌های استروئیدی را کاهش می‌دهد. همچنین تخمک‌گذاری در آنان دچار اختلال می‌شود(۲۵). تحقیق‌های انجام شده گویای اختلالات چندگانه در عملکرد تخمدان افراد دیابتی است. این اختلالات به‌صورت کاهش تعداد دستجات فولیکولی، بی‌نظمی‌های قاعدگی و کاهش سطح سرمی استرادیول نمایان می‌شود(۲۶). پژوهشی در زمینه تعیین اثر دیابت بر سطح سرمی گنادوتروپین‌ها و هورمون‌های جنسی در موش‌های صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده کاهش فعالیت محور هورمونی هیپوفیز- بیضه و کاهش سطح سرمی LH و FSH بوده است. محققین افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی که هر دو از عوارض دیابت است را از دلایل اصلی کاهش فعالیت محور هورمونی هیپوفیز- بیضه دانستند(۲۷). محققین گزارش کردند دیابت سبب اختلالات جنسی در زنان می‌شود و درصد بالایی از بیماران دیابتی نقص در فعالیت جنسی را به‌صورت کاهش میل جنسی و کاهش قدرت باروری نشان می‌دهند. هم‌چنین مشخص شده است این بیماری بر تخمک‌گذاری تأثیر گذاشته و اثر خود را به‌صورت کاهش دستجات فولیکولی و کاهش تخمک‌گذاری اعمال می‌کند(۲۸). نتایج تحقیق نادری و همکاران نشان داده است اختلال عملکردی در سیستم تولید مثلی زنان دیابتی محدود به تغییر فعالیت محور هورمونی هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان نمی‌شود، بلکه آسیب بافتی و اختلال در عملکرد تخمدان را شامل می‌شود. هم‌چنین کاهش وزن تخمدان و کاهش ترشح استروژن در زنان دیابتی مشاهده شد و عنوان شد شرایط استرس‌اکسیداتیو فاکتور مؤثری در پیشرفت عوارض دیابت است و دلیل مهمی در کاهش تخمک‌گذاری و آسیب به سیستم تولید مثلی زنان دیابتی می‌باشد(۲۹). پژوهش استوان و همکاران نشان داد سطح سرمی هورمون‌های گنادوتروپین در موش‌های صحرایی دیابتی نر در مقایسه با نمونه‌های سالم به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد و طبق تحقیق‌های به عمل آمده کاهش مصرف گلوکز به وسیله هیپوفیز قدامی سبب کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود(۳۰). از طرف دیگر آزمایش‌های حیوانی ترشح ناکافی گنادوتروپین‌ها را در نمونه‌های دیابتی نشان دادند. علت این کاهش، آزادسازی ناکافی هورمون آزادکننده گنادوتروپین و یا پاسخ‌دهی ناکافی هیپوفیز به هورمون آزادکننده گنادوتروپین است(۳۱). بر

اساس مطالعه وولف و همکاران انسولین، هیپوتالاموس و هیپوفیز را جهت ترشح هورمون‌های آزادکننده گنادوتروپین و گنادوتروپین‌ها تحریک می‌کند. بنابراین کاهش ترشح انسولین در دیابت نوع یک منجر به کاهش سطح سرمی گنادوتروپین‌ها می‌شود. هم‌چنین دیابت با تغییر فعالیت محور هورمونی هیپوفیز- تخمدان موجب اختلال در تکوین و کاهش فولیکول‌های تخمدانی می‌شود(۳۲).استورم و همکاران گزارش کردند دیابت بر میزان ترشح هورمون پرولاکتین مؤثر است و با کاهش فعالیت سلول‌های لاکتوتروف در قسمت پیشین غده هیپوفیز موجب کاهش ترشح پرولاکتین می‌شود(۳۳). که با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر هم‌سو است.

با توجه به نتایج به‌دست آمده سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در گروه دیابتی تیمار شده با عصاره آبی برگ گیاه حرا با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با نمونه‌های دیابتی تیمار نشده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. هم‌چنین تعداد جسم زرد، فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در مقایسه با نمونه‌های دیابتی تیمار نشده به‌طور معنی‌داری افزایش و فولیکول آترزی شده به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. افزایش هم‌زمان در سطح سرمی استروژن و هورمون‌های گنادوتروپین نشان‌دهنده تأثیر عصاره حرا بر فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز- تخمدان است. این تأثیر می‌تواند به دلیل افزایش ترشح هورمون‌های گنادوتروپین از هیپوفیز پیشین و به دنبال آن افزایش سطح هورمون استروژن در سرم باشد. بر اساس تحقیقات انجام شده سطح بالای آرژنین موجود در عصاره حرا می‌تواند به نیتریک اکسید تبدیل شود(۳۴). نیتریک اکسید با افزایش آزادسازی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین، آزادسازی گنادوتروپین‌ها را توسط غده هیپوفیز افزایش می‌دهد(۳۵). هم‌چنین نیتریک اکساید با افزایش ترشح گنادوتروپین‌ها منجر به افزایش اسپرماتوژنز در مردان می‌شود(۳۶). در جنس ماده، نیتریک اکساید نقش مهمی در تحریک تخمک‌گذاری دارد(۳۷). آسپارتیک اسید یکی دیگر از آمینو اسیدهای موجود در گیاه حرا است(۳۴) و مشخص شده است آسپارتیک اسید اثر تحریکی بر ترشح هورمون‌های آزاد کننده گنادوتروپین دارد. این آمینو اسید سنتز هورمون‌های گنادوتروپین و تستوسترون را به واسطه گوانوزین مونوفسفات حلقوی و آدنوزین مونو فسفات حلقوی به عنوان پیامبرهای ثانویه به ترتیب در هیپوفیز و بیضه تنظیم می‌کند(۳۸). با توجه به ترکیب‌های فیتواستروژنی گیاه حرا(۱۴)، مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد مصرف فیتواستروژن‌های گیاهی می‌تواند سطح پلاسمایی پرولاکتین را افزایش دهد که این افزایش می‌تواند ناشی از اثرات استروژنیک فیتواستروژن‌ها در هیپوتالاموس و هیپوفیز باشد که منجر به سنتز پرولاکتین از هیپوفیز پیشین می‌شود(۳۹). هم‌چنین مشخص شده است فیتواستروژن‌ها اثرات استروژنیک دارند و با اثر بر سلول‌های تولید کننده گنادوتروپین

در هیپوفیز سبب تحریک ترشح گنادوتروپین‌ها و افزایش فعالیت محور هورمونی هیپوفیز ـ گنـــــاد می‌شوند(۴۰). مطالعه آهنگ‌پور و همکاران نشان داده است فلاونوئیدها با افزایش فعالیت محور هورمونی هیپوفیز- بیضه موجب افزایش جبرانی سطح سرمی تستوسترون می‌شود و با افزایش اسپرماتوژنز تعداد اسپرم‌ها در موش‌های صحرایی دیابتی به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد(۴۱). طی مطالعه‌ای غلامی و همکاران به بررسی اثر عصاره برگ گیاه حرا بر آسیب کبدی القا شده با تتراکلرید کربن پرداختند. نتایج گویای اثر محافظتی این عصاره بر آسیب کبدی می‌باشد و این اثر به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فلاونوئیدی گیاه حرا نسبت داده شد. هم‌چنین گزارش شده تجویز عصاره حرا به موش‌های صحرایی مدل آسیب کبدی القاء شده با تتراکلرید کربن، موجب کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌شود. مهم‌ترین دلیل این اثر را ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز موجود در عصاره برگ گیاه حرا دانستند و مشخص شده است ترکیبات فلاونوئیدی گیاه حرا از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی خود منجر به حفظ ثبات و پایداری غشای سلول می‌شوند و با اثر محافظتی خود آسیب وارده به بافت کبد را بهبود می‌دهد(۴۲). با توجه به اینکه دیابت موجب کاهش فعالیت بافتی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ایجاد روند التهاب و آسیب بافتی می‌شود(۲)، می‌توان افزایش دستجات فولیکولی و بهبود روند تخمک‌گذاری در موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ گیاه حرا را به اثر محافظتی و ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در این عصاره نسبت داد. پژوهشی دیگر به بررسی اثر عصاره برگ گیاه حرا بر بافت بیضه و فرند اسپرم-سازی در موش‌های صحرایی تیمار شده با تتراکلرید کربن پرداخت. مشخص شد عصاره برگ گیاه حرا به دلیل داشتن ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی فراوان، دارای اثرات محافظتی در برابر اثرات توکسیک تتراکلرید کربن است و می‌تواند با کاهش سطح بافتی رادیکال-های آزاد موجب بهبود عملکرد بیضه و افزایش روند اسپرماتوژنز شود(۱۴). این نتایج با دستاوردهای پژوهش حاضر همسو می‌باشد زیرا پس از تجویز عصاره برگ گیاه حرا به موش‌های صحرایی دیابتی، تعداد دستجات فولیکولی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی عصاره افزایش یافت. طبق تحقیقات انجام شده عصاره آبی و آبی ـ الکلی بـــرگ گیاه حرا دارای تأثیر هیپوگلیسمی در موش‌های صحرایی دیابتی است. گزارش شد تجویز غلظت‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره حرا برای سه روز متوالی موجب افزایش ترشح انسولین و کاهش سطح سرمی گلوکز در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. محققین عنوان کردند اثرات هیپوگلیسمی عصاره برگ گیاه حرا ناشی از ترکیب‌های گلیکوپپتید، ترپنوئید، آلکالوئید، فلاونوئید، فنل‌ها، کومارین و سایر ترکیب‌های بیولوژیکی فعال آن می‌باشد که اثرات ضد دیابتی آن‌ها به اثبات رسیده است(۱۵). بنابراین می-توان احتمال داد یکی دیگر از دلایلی که موجب افزایش

فعالیت محور هورمونی هیپوفیز- تخمدان و افزایش دستجات فولیکولی در موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با عصاره برگ گیاه حرا شده است، خواص ضد دیابتی آن است. به عبارت دیگر تجویز عصاره با کاهش عوارض دیابت موجب افزایش فعالیت محور هیپوفیز- تخمدان، افزایش تعداد دستجات فولیکولی و بهبود روند تخمک‌گذاری شده است. افزایش التهاب سلولی ناشی از شرایط استرس اکسیداتیو از عوارض شایع دیابت است(۴۳). طبق مطالعه گندمی و همکاران مشخص شده است عصاره برگ گیاه حرا حاوی ترکیب‌هایی است که خواص ضد التهابی قابل ملاحظه‌ای دارد. این ترکیب‌ها با جلوگیری از آزادسازی سیتوکین‌های التهابی فرآیند التهاب را کنترل می‌کنند(۱۹). بنابراین می‌توان گفت عصاره گیاه حرا با کاهش التهاب در بافت تخمدان و غده هیپوفیز موش‌های صحرایی دیابتی، موجب افزایش فعالیت محور هیپوفیز- تخمدان و افزایش تعداد دستجات فولیکولی شده است.

جهت بررسی علل نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، جداسازی مواد و ترکیب‌های موجود در عصاره برگ گیاه حرا و انجام مطالعه‌های مولکولی نیاز است. نظر به این که انجام چنین آزمایش‌هایی مستلزم داشتن امکانات و تجهیزات پیشرفته‌ای است، لذا عدم بررسی‌های سلولی و مولکولی در مورد نتایج به‌دست آمده و عدم امکانات لازم جهت بررسی مکانیسم دقیق ترکیب‌های عصاره برگ گیاه حرا بر فعالیت محور هورمونی هیپوفیز- گناد و بافت تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد. پیشنهاد می‌شود مطالعه‌های تکمیلی، پیرامون شناخت دقیق مکانیسم‌های سلولی و مولکولی ترکیب‌های عصاره برگ گیاه حرا در کنترل اختلالات بافتی و هورمونی ناشی از دیابت انجام شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت افزایش سطح سرمی گنادوتروپین‌ها، استروژن، پروژسترون و پرولاکتین در موش‌های صحرایی دیابتی ماده احتمالاً به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و هیپوگلیسمیک عصاره آبی برگ گیاه حرا و نقش آن در افزایش فعالیت محور هورمونی هیپوتالاموس- هیپوفیز- تخمدان است. هم‌چنین با توجه به نتایج به‌دست آمده از شمارش تعداد فولیکول‌های تخمدانی می‌توان نتیجه گرفت تجویز وابسته به دوز عصاره آبی برگ گیاه حرا از طریق نقش محافظتی آن بر بافت تخمدان و افزایش دهنده فعالیت محور هورمونی هیپوفیز- تخمدان، موجب کاهش تعداد فولیکول‌های آترزی، افزایش تعداد دستجات فولیکولی و جسم زرد شده و از این طریق موجب بهبود تخمک‌گذاری در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. از این‌رو گیاه حرا به‌عنوان یک فرآورده طبیعی می‌تواند از اختلالات هورمونی و ناباروری در بیماران دیابتی جلوگیری کند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجوی رشته بیوشیمی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد می‌باشد. هم‌چنین نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند.

REFERENCES

1.Melendez-Ramirez LY, Richards RJ, Cefalu WT. Complications of Type 1 Diabetes. Endocrinol Metab Clin North Am 2010; 39(3): 625-40.
2.Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. Eur J Pharmacol 2010; 636(1-3): 8-17.
3.Pasupathi P, Chandrasekar V, Senthil Kumar U. Evaluation of oxidative stress, enzymatic and non-enzymatic antioxidants and metabolic thyroid hormone status in patients with diabetes mellitus. Diabetes Metab Syndr 2009; 3(3): 160-5.
4.Khajouee E, Elahi-Moghaddam Z, Behnam-Rasouli M, Mahdavi-Shahri N. Comparative study of the effects of type I and type II diabetes on biochemical factor slevels & histological changes in thyroid gland in male wistar rats. Ijdld 2014; 13(5): 375-82.
5.Pournaghi P, Sadrkhanlou R, Hasanzadeh Sh, Farshid AA. The ultrastructural study of oocyte and zona pellucida in ovarian follicles of untreated and and metformin-treated diabetic rats subsequent to induction of experimental diabetes. Tumj 2011; 69(6): 366-73.
6.Hosseini SE, Hjeidari M. Effect of Valsartan on the hormones of Pituitary-gonadal axis Performance in mature female Wistar Rats. J Birjand Univ Med Sci 2013; 19(4): 409-15.
7.McCance DR. Pregnancy and diabetes. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2011; 25(6): 945-58.
8.Ribeiro M.C, Nakamura M.U, Scanavino Mde T, Torloni M.R, Mattar R. Female sexual function and gestational diabetes. J Sex Med 2012; 9(3): 786-92.
9.Ostovan F, Gol A, Olomi H. Effects of c*itrullus colocynthis* pulp on serum testosterone and LH levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Physiol Pharmacol 2014; 18(3): 347-53.
10.Sadoughi SD. Effect of curcumin and low frequency electromagnetic field on the hormones of pituitary-gonad axis in male diabetic rats. Horizon Med Sci 2017; 23(1): 31-8.
11.Sadoughi SD. Investigation the effect of curcumin on the hormones of pituitary-ovarian axis in alloxan-induced diabetic rats. J Ardabil Univ Med Sci 2016; 16(4): 441-51.
12.Pournaghi P, Sadrkhanlou R, Hasanzadeh S, Farshid A. The ultrastructural study of oocyte and zona pellucida in ovarian follicles of untreated and and metformin-treated diabetic rats subsequent to induction of experimental diabetes. Tehran Univ Med J 2011; 69(6): 366-73.
13.Patel NT, Gupta A, Pandey AN. Salinity tolerance of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh from Gujarat Coasts of India. Aquat Bot 2010; 93(1): 9-16.
14.Soleimani Z, Mirazi N. The Effect of *Avicennia marina* hydroethanolic leaf extract on testes tissue and spermatogenesis in male rats induced with carbon tetrachloride. Armaghane Danesh 2015; 20(8): 677-88.
15.Fathi-Moghaddam H, Mokhtari M, Kamaei L, Ahangar-pour A. Effects of *avicennia marina* leaves aqueous and hydro alcoholic extract on streptozotocin-induced diabetic male rats. J Rafsanjan Univ Med Sci 2011; 10(4): 245-54.
16.Itoigawa M, Ito C, Tan HT-W, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, et al. Cancer chemo-preventive activity naphthoquinones and their analogs from Avicennia plants. Cancer Lett 2001; 174: 135-9.
17.Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM. New flavonoids from *Avicennia marina.* Fitoterapia 2000; 71(3): 274-7.
18.Zamani Gandomani M, Forouzandeh Malati E. Antinociceptive effect of extract of mangrove (*Avicennia marina*) in male rats. MJTUOMS 2014; 36(1): 34-9.
19. Zamani Gandomani M, Forouzandeh Molaali E, Zamani Gandomani Z, Madani H, Jamal Moshtaghian S. Evaluation of Anti-inflammatory effect of hydroalcoholic extract of mangrove (*Avicennia marina*) leaves in male rats. MJTUOMS 2012; 34(4): 80-5.
20.Sadoughi SD, Chamipa M. Effects of aqueous extract of *Holothuria arenicola* and low frequency electromagnetic field on serum insulin, glucose and beta-amyloid (Aβ1-42) in diabetic rats. Feyz 2016; 20(1): 1-10.
21.Sepehri-Moghadam H, Rahbarian R, Sadoughi SD. The effect of aqueous extract of *Launaea acanthodes* (Boiss.) O. Kuntze on the serum level of insulin and blood glucose and histomorphological changes of pancreas in diabetic rats. Feyz 2015; 19(1): 30-7.
22.Bekyürek T, Liman N, Bayram G. Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (Chinchilla lanigera). Lab Anim 2002; 36(1): 51-60.
23.Nabiuni M, Panahandeh SR, Doostikhah S, Karimzadeh Bardei L. The effects of hydro alcoholic extract of raspberry fruit on ovarian follicles and serum parameters in poly cystic ovary syndrome-induced rat. Armaghane Danesh 2015; 19(11): 955-68.

24.Jones TB, Savasan ZA, Johnson Q, Bahado-Singh R. Management of pregnant patients with diabetes with ischemic heart disease. Clin Lab Med 2013; 33(2): 243-56.
25.Codner E, Eyzaguirre FC, Iñiguez G, López P, Pérez-Bravo F, Torrealba IM, et al. Ovulation rate in adolescents with type 1 diabetes mellitus. Fertil Steril 2011; 95(1): 197-202.
26.Codner E, Soto N, Lopez P, Trejo L, Avila A, Eyzaguirre FC, et al. Diagnostic criteria for polycystic ovary syndrome and ovarian morphology in women with type 1 diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(6): 2250-6.
27.Bélanger LCA, Labrie CSF. Impairment of pituitary and gonadal functions in alloxan-induced diabetic male rats. Mol Cell Endocrinol 1980; 18(3): 165-76.
28.Brudenell M, Beard R. Diabetes in pregnancy. Clin Endocrinol Metab 1972; 1(3): 673-95.
29.Nandi A, Poretsky L. Diabetes and the female reproductive system. Endocrinol Metab Clin North Am 2013; 42(4): 915-46.
30.Ostovan F, Gol A, Olomi H. Effects of citrullus colocynthis pulp on serum testosterone and lh levels in streptozotocin induced diabetic rats. Physiol Pharmacol 2014; 18(3): 347-53.
31.Steger RW, Rabe MB. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. Proc Soc Exp Biol Med 1997; 214(1): 1-11.
32.Wolfe A, Divall S, Wu S. The regulation of reproductive neuroendocrine function by insulin and insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Front Neuroendocrinol 2014; 35(4): 558-72.
33.Ostrom KM, Ferris AM. Prolactin concentrations in serum and milk of mothers with and without insulin-dependent diabetes mellitus. Am J Clin Nutr July 1993; 58(1): 49-53.
34.Popp M, Larher F, Weigel P. Chemical Composition of australian mangroves iii. free amino acids, total methylated onium compounds and total nitrogen. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie 1984; 114(1): 15-25.
35.González-Flores O, Gómora-Arrati P, Garcia-Juárez M, Gómez-Camarillo MA, Lima-Hernández FJ, Beyer C, et al. Nitric oxide and ERK/MAPK mediation of estrous behavior induced by GnRH, PGE2 and db-cAMP in rats. Physiol Behav 2009; 96(4-5): 606-12.
36.Ragimov IG, Esipov AV. The role of nitric oxide in correction of spermatogenesis impairment in varicocele. Reprod Biomed Online 2010; 20: 31.
37.Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, Kalra SP. Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced luteinizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids. Endocrinology 1993; 133(6): 2481-7.
38.Pampillo M, Scimonelli T, Bottin MC, Duvilanski BH, Rettori V, Seilicovich A, et al. The effect of D-aspartate on luteinizing hormone-releasing hormone, α-melanocyte-stimulating hormone, GABA and dopamine release. Neuroreport 2002; 13(17): 2341-4.
39.Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. J Nutr 1997; 127(2): 263-9.
40.Glazier MG, Bowman MA. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. Arch Intern Med 2001; 161(9): 1161-72.
41. Ahangarpour A, Oroojan A, Heydari H. Effect of Hydro-Alcoholic Extract of Dorema Aucheri on Serum Levels of Testosterone, FSH and Sperm Count in Nicotinamide-STZ- Induced Diabetic Rat Models. ZUMS Journal 2013; 21(87): 22-31.
42.Gholami M, Mirazi N. Study of Hepato Protective Effects of *Avicennia marina* Hydro Ethanolic Leaves Extract in Male Rats Induced With Carbone Tetrachloride. Armaghane Danesh 2016; 20(10): 858-72.
43.Domingueti CP, Dusse LM, Carvalho Md, De Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular. J Diabetes Complications 2016; 30(4): 738-45.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effect of Aqueous Extract of Mangrove Leaves (*Avicennia marina*) on Pituitary-Hormones of Gonadal Axis and Ovarian Follicle Numbers in Diabetic Rats

Rahbarian R[1], Sadoughi SD[2*], Esmaeili Sabzevar H[1]

[1]Department of Biology, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran, [2]Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Received: 4 Oct 2016 Accepted: 1 May 2017

ABSTRACT

Background & aim: Reproductive disorders is one of the major issues in diabetic people and various chemical and herbal medicines has been used for its treatment. Due to the antioxidant and hypoglycemic properties of *Avicennia marina*, the aim of this study was to determine the effects of mangrove leaves aqueous extract on serum levels of hormones of pituitary- gonadal axis and ovarian follicle numbers in diabetic rats.

Methods: In the present experimental study, 32 female Wistar rats were allocated into equal groups of control, non-treated diabetic and two diabetic groups treated with mangrove leaves aqueous extract at concentrations of 100 and 200 mg/kg. The diabetes in non-treated diabetic and treated diabetic groups with mangrove extract was induced using an intraperitoneal injection of 120 mg/kg alloxan.
Aqueous extract of mangrove leaves were injected to treated diabetic groups, very other day for one month. Saline solution was injected to the animals of control and non-treated diabetic groups. At the end of exprement, serum levels of LH, FSH, estrogen, progesterone and prolactin were measured by ELISA. 5 µm sections of ovarian tissue were prepared and stained with Hematoxylin and Eosin. Then, ovarian follicle numbers were examined by light microscope. Data was analyzed using one-way ANOVA and Post Hoc Tukey statistical tests.

Results: Compared to control group, serum levels of LH, FSH, estrogen, progesterone and prolactin significantly decreased in non-treated diabetic group ($p<0.05$). Also, number of corpus luteum, primordial, primary, secondary and graph follicle significantly decreased and number of atresia follicle significantly increased compared to the control group ($p<0.05$). Compared to non-treated diabetic group, administration of mangrove leaves aqueous extract with concentrations of 100 and 200 mg/kg significantly increased serum levels of LH, FSH, estrogen, progesterone and prolactin ($p<0.05$). Also, number of corpus luteum, primordial, primary, secondary and graph follicle significantly increased and number of atresia follicle significantly decreased compared to non-treated diabetic group ($p<0.05$).

Conclusions: The results indicate significant effect of mangrove leaves extract on increases serum levels of gonadotropins, estrogen, progesterone and prolactin in diabetic rats. Also it has protective effect on ovarian tissue. Therefore, consumption of *Avicennia marina* could be effective in improving hormonal disorders and ovarian tissue damage in patients with diabetes.

Keywords: Diabetes, Ovary, *Avicennia marina*, Gonadotropin, Rat

[*]**Corresponding Author: Sadoughi SD,** Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.
Email: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

Please cite this article as follows:
Rahbarian R, Sadoughi SD, Esmaeili Sabzevar H. The Effect of Aqueous Extract of Mangrove Leaves (Avicennia marina) on Pituitary- Hormones of Gonadal Axis and Ovarian Follicle Numbers in Diabetic Rats. Armaghane-danesh 2017; 22 (1): 1-17.