مقاله پژوهشی

اثر فلاونوئید تام اندام هوایی گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر میزان Bax، Bcl-2 و شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو اسپرم اپیدیدیمی موش‌های صحرایی دیابت نوع یک

راهله رهباریان*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: ra_rahbarian@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱

DOI: 10.22034/ascij.2023.1986593.1494

چکیده

دیابت دستگاه تولید مثلی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و سبب اختلالات باروری در این بیماران می‌شود. با توجه به خواص آنتی-اکسیدانی و هیپوگلیسمیک گیاه حرا، هدف از این مطالعه تعیین اثر فلاونوئید تام اندام هوایی گیاه حرا بر میزان Bax، Bcl-2 و شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو اسپرم اپیدیدیمی موش‌های صحرایی دیابت نوع یک می‌باشد. در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به گروه‌های مساوی شاهد، شاهد دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار تقسیم شدند. گروه‌های دیابتی تحت تیمار به مدت ۳۰ روز غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید برگ گیاه حرا دریافت نمودند. در پایان دوره درمان اسپرم‌ها از اپیدیدیم استخراج شدند. سپس میزان Bax، Bcl-2، مالون‌دی‌آلدئید همچنین میزان آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در نمونه‌های اسپرم و همچنین قند خون ناشتا و میزان ۸ هیدروکسی ۲ داکسی گوانوزین (HOdG) در نمونه‌های مورد بررسی توسط روش الایزا سنجش شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، میزان Bcl-2، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در نمونه‌های اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز تزریقی به‌طور معنی-داری افزایش و سطوح Bax و مالون‌دی‌آلدئید، FBS و HOdG به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < ۰/۰۵$). تجویز فلاونوئید برگ گیاه حرا سبب کاهش آپوپتوزیس و استرس‌اکسیداتیو در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک می‌شود.

کلمات کلیدی: دیابت، حرا، آپوپتوزیس، اسپرم، موش صحرایی.

مقدمه

دیابت ملیتوس یک اختلال متابولیکی است و به-صورت افزایش مزمن قند خون پدیدار می‌شود. دیابت نوع یک غالبا در نتیجه نارسایی ترشح انسولین، فعالیت آن یا هردو می‌باشد (۲۰). تحقیقات نشان داده است دیابت منجر به ایجاد عوارضی از قبیل استرس اکسیداتیو (۲۱)، افزایش پراکسیداسیون لیپیدی (٦) و با ایجاد اختلال در فرایند فسفریلاسیون اکسیداتیو و کاهش تولید انرژی، موجب مرگ سلول‌ها می‌شود (۲۸). همچنین مشخص شده است دیابت ملیتوس با کاهش سطح گنادوتروپین‌ها و تستوسترون سبب تحلیل بیضه، غدد ضمیمه و کاهش اسپرماتوژنز می-شود (۷). تحقیقات نشان داده است سلول‌های سوماتیک دارای محافظ‌های آنزیمی سیتوپلاسمی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز

هستند، اما سلول‌های اسپرم طی فرایند بلوغ مقدار زیادی از سیتوپلاسم خود را از دست می‌دهند، در نتیجه از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی کمتری بهره می‌برند (۳۵). با توجه به اینکه سلول‌های اسپرم مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع دارند. همین امر غشای آن‌ها را نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو مستعد می‌سازد (۲٤). مشخص شده است در مایع اسپرمی مبتلایان به بیماری دیابت مولکول‌های واکنش‌گر و رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شوند که تحرک اسپرم، قابلیت زنده‌مانی، فعالیت آنزیمی درون‌سلولی، قدرت باروری و عملکرد اسپرم را مختل می‌کنند (۸). همچنین در اسپرم مبتلایان به دیابت ملیتوس میزان مالون دی‌الدئید افزایش می‌یابد ولی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد (۲۵).

فرایند آپوپتوزیس تحت تاثیر ژن‌های خانواده Bcl-2 شامل Bcl-2، Bcl-xl، Bax، Bad و خانواده کاسپاز تنظیم می‌شود. خانواده Bcl-2 می‌توانند هم نقش القایی و هم نقش مهاری در فرایند آپوپتوزیس داشته باشد. برخی از اعضای این خانواده در مهار (Bcl-2 و Bcl-xl) و برخی دیگر در القاء فرایند آپوپتوزیس (Bad, Bax, Bax, Bcl-xs) نقش دارند (۱۹). نسبت عوامل القاء کننده و مهار کننده، نقش مهمی در بقاء سلول و یا در شروع فرایند آپوپتوزیس بر عهده دارد. در صورت کاهش میزان بیان ژن Bcl-2، فرایند آپوپتوزیس به‌واسطه فعال شدن پروتئین p53 شروع می‌شود (۲۲، ۲۷). پروتئین Bax به‌عنوان القاء کننده فرایند آپوپتوزیس عمل می‌کند. پروتئین مذکور در شرایط طبیعی به میزان بسیار اندک در سیتوپلاسم قرار دارد ولی به هنگام القاء فرایند آپوپتوزیس بیان آن به‌صورت الیگومر در غشای خارجی میتوکندری افزایش می‌یابد. در این حالت کانال‌هایی را در غشای خارجی میتوکندری تشکیل می‌دهد که به دنبال آن از خلال این کانال‌ها سیتوکروم C از میتوکندری به درون سیتوپلاسم وارد می‌شود و به دنبال آن سیتوکروم C سبب تحریک آبشار کاسپازها می‌شود (۲۲، ۲۷). مطالعات نشان داده است شرایط استرس‌اکسیداتیو می‌تواند محرکی برای شروع فرایند آپوپتوزیس باشد. همچنین مشخص شده است افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن با القاء استرس‌اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو DNA می‌توانند موجب شروع فرایند آپوپتوزیس شود (۹). از این رو، ۸ هیدروکسی ۲ داکسی گوانوزین(HOdG) مکرراً به عنوان فراوانترین ضایعه بازی اکسایش یافته تولید می‌شود. سطح HOdG در طی تعداد زیادی از بیماری‌ها مانند سرطان، اترواسکلروزیس، دیابت و بیماری آلزایمر افزایش می‌یابد (۹).

گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh از خانواده Avicenniaceae یکی از اعضاء گیاهان مانگرو می‌باشد. گیاه حرا غنی از انواع فیتوالکسین‌ها، استروئیدها، اسیدهای کربوکسیلیک، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و تری‌ترپن‌ها می‌باشد (۳۰). 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 (۳٦). در پژوهشی مشخص شده است فلاونوئیدهای گیاه حرا از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند (۳٤). گزارش شده است عصاره برگ گیاه حرا دارای اثرات ضد دردی می‌باشد و این اثرات به فلاونوئید و تانن موجود در آن نسبت داده شد (۳۲). تحقیقات نشان می‌دهد برگ گیاه حرا دارای خواص ضد التهابی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد و می‌تواند موجب بهبود آرتریت در موش‌های صحرایی شود (۳۸). همچنین گزارش شده است ترکیب‌های

آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه حرا دارای اثر محافظتی بر بافت بیضه و روند اسپرم‌سازی در موش‌های صحرایی تیمار شده با تتراکلریدکربن دارد (۳۹). تحقیقات نشان داده است فلاونوئیدها با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بصورت وابسته به دوز سبب حفظ حرکت اسپرم منجمد شده می‌شود (۲۶). با توجه به روند رو به رشد استفاده از گیاهان دارویی و وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در گیاه حرا این پژوهش با هدف تعیین اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، همچنین میزان مالون-دی‌آلدئید بافت تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی، انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار استفاده شد. تعداد ۳۲ سر موش صحرایی با محدوده سنی ۵ ± ۱۴۰ روز و محدوده وزنی ٦ ± ١٦٥ گرم در دمای محیطی ٤ ± ٢٤ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵ ± ۳۵ درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف قرار داشتند و آب به مقدار کافی توسط بطری پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتر در اختیار آن‌ها قرار داده شد. همچنین از غذای فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد تغذیه نمودند. به‌منظور حصول سازش با محیط، آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز بعد از استقرار حیوانات به انجام رسید. موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی به ٤ گروه (در هر گروه ۸ سر موش صحرایی) شامل گروه شاهد، گروه شاهد دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا (HPLC ≥ 85.0%) تقسیم شدند. گروه‌های شاهد و شاهد دیابتی به مدت ۳۰ روز و به‌صورت داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین به‌عنوان حلال دارو دریافت کردند. دو گروه دیابتی تحت تیمار، به مدت ۳۰ روز و به‌صورت داخل صفاقی با ۰/۵ میلی‌لیتر فلاونوئید با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تیمار شدند. مدل تجربی دیابت (دیابت نوع ۱) در موش صحرایی با یک‌بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات (Sigma-Aldrich, Germany) به‌میزان ۱۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ایجاد شد. همچنین از بافر سیترات (pH=۵/٤) به‌عنوان حلال آلوکسان استفاده گردید. آلوکسان به گروه شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم فلاونوئید تام 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 قند خون توسط دستگاه گلوکومتر مدل IGM-0002A (EasyGluco, Korea) اندازه‌گیری شد. قندخون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد (۱۳).

در پایان دوره درمان و به منظور استخراج اسپرم از اپی‌دیدیم ابتدا موش‌ها به روش دررفتگی گردنی (Cervical dislocation) کشته شدند و در ادامه با بازکردن حفره شکمی اپی‌دیدیم برداشته شد. اپی-دیدیم به قطعات کوچک تقسیم گردید و با ۲ میلی‌لیتر محلول نرمال سالین شستشو داده شد. سپس جهت خروج اسپرم‌ها از لوله‌های اپیدیدیم به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌های اسپرم با سرعت ۳۵۰۰ دور دقیقه (RPM) و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس توسط بافر سیترات شستشو و سه مرتبه سانتریفوژ تکرار شد. در نهایت محلول سطحی حذف و اسپرم‌های باقی‌مانده به

همراه بافر تریس (pH=۷/٤، Molarity=۱) (Sigma-Aldrich, Germany) به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه هموژنایزر با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه و در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شدند (۲۲). جهت جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد و از محلول ۰/۵ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید به‌عنوان مهارکننده آنزیم‌های اسپرم استفاده شد. پارامترهای پژوهش حاضر توسط روش ELISA، دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax-2100, USA) و کیت‌های ساخت شرکت فاین تست (China) سنجش شد. کیت Bcl-2 دارای حساسیت <۹/۳۷۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/٦۲۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر، کیت Bax دارای حساسیت <۰/۱۸۸ نانوگرم/میلی‌لیتر و محدوده ۲۰-۰/۳۱۲ نانوگرم/میلی‌لیتر، کیت سوپر اکسید دیسموتاز دارای حساسیت <۹/۳۷۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/٦ پیکوگرم/میلی‌لیتر، کیت کاتالاز دارای حساسیت <۱۸/۷۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲ پیکوگرم/میلی‌لیتر، کیت گلوتاتیون پراکسیداز دارای حساسیت <۱۸/۷۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر و کیت مالون دی‌آلدئید دارای حساسیت <۱۸/۷۵ نانوگرم/میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵ نانوگرم/میلی‌لیتر می‌باشد.

اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش۲۲ تحلیل شد. با توجه به این‌که نتایج به‌دست آمده کمی است، توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها برقرار شد (p >۰/۰۵). داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شد. همچنین نتایج به‌دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت خطای معیار میانگین ± میانگین گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

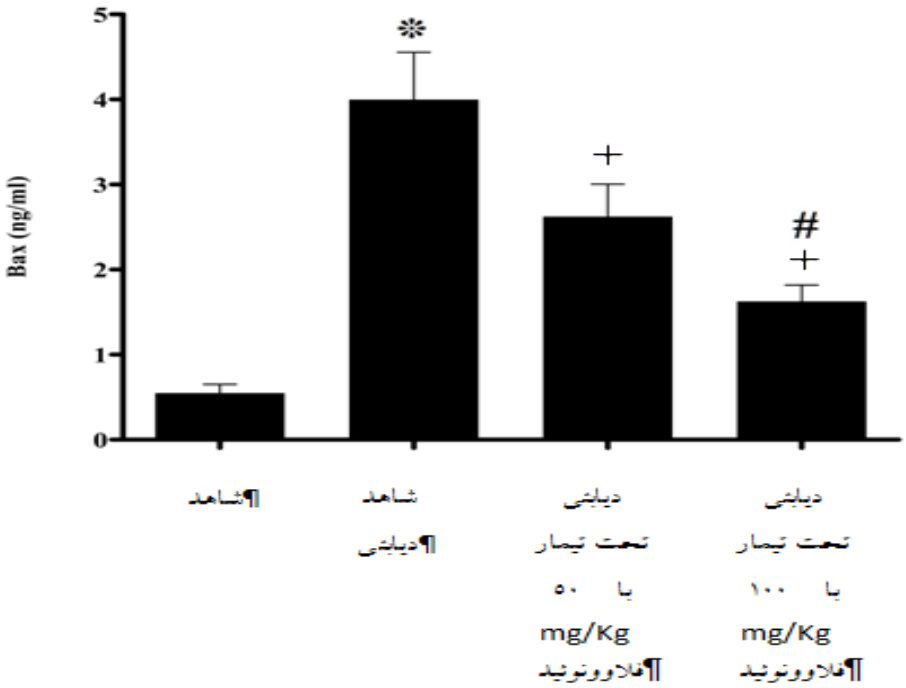
تحلیل داده‌های این مطالعه نشان داد که میزان قند خون و میزان۸ هیدروکسی ۲ داکسی گوانوزین (HOdG) در گروه تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p < ۰/۰۵) (جدول ۱). گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم کاهش معنی داری در میزان قند خون و ۸ هیدروکسی ۲ داکسی گوانوزین ایجاد نمود (p < ۰/۰۵) (جدول ۱).

میزان Bcl-2 در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵). گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم افزایش معنی‌داری در میزان Bcl-2 در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ایجاد نمود (p < ۰/۰۵) (نمودار۲). میزان Bax در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی-گرم/کیلوگرم فلاونوئید در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p < ۰/۰۵) (نمودار۱). میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵) (نمودار٤، ۵ و ٦). گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید تام

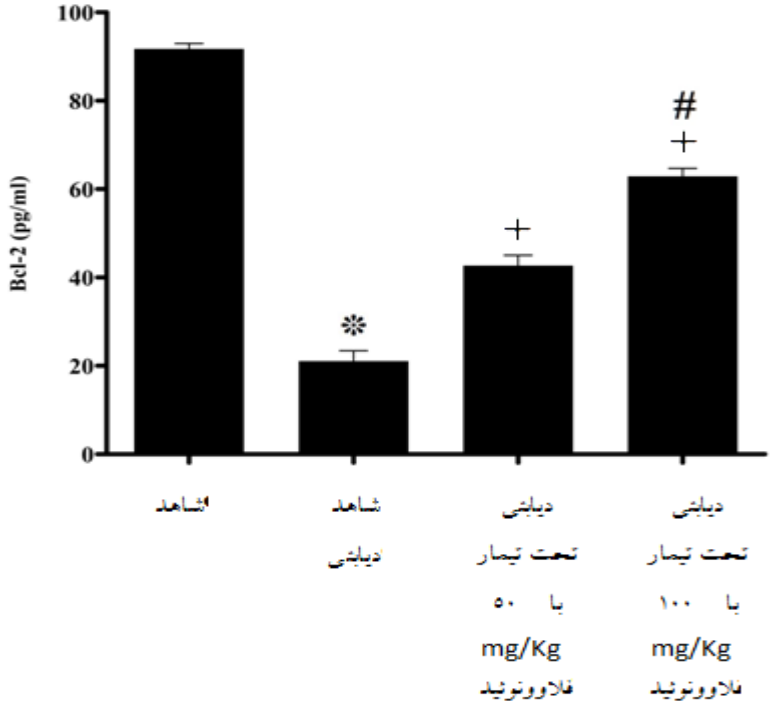
برگ گیاه حرا افزایش معنی داری در میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم ایجاد نمود ($p < ۰/۰۵$) (نمودار٤، ٥ و ٦). میزان مالون‌دی‌آلدئید در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < ۰/۰۵$) (نمودار۳).

جدول ۱- میانگین قند خون ناشتا (FBS) و ۸ هیدروکسی ۲ داکسی گوانوزین (HOdG) در گروه‌های مورد مطالعه

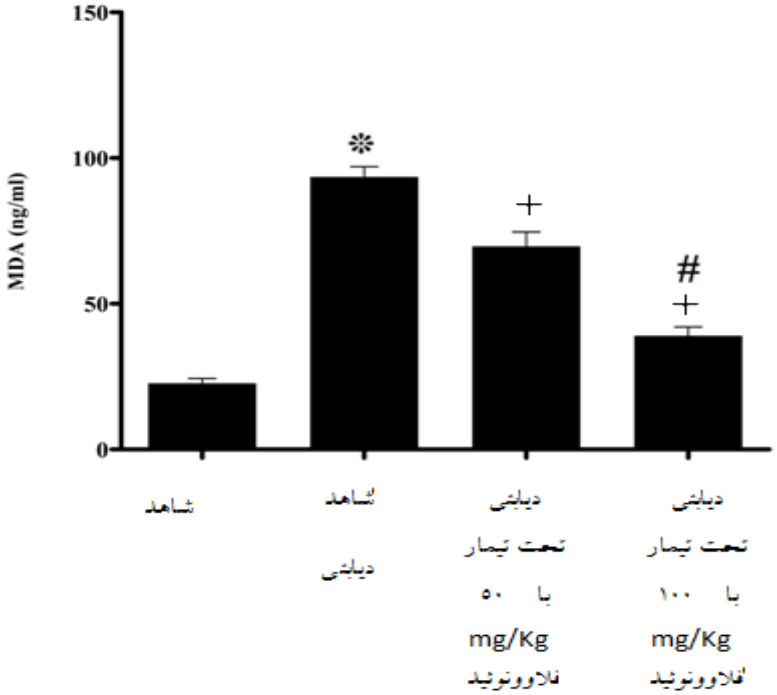
گروه/نمونه	قند خون ناشتا (mg/dl)	(ng/ml) HOdG
شاهد سالم	٨١ ± ٦	٤/٩٧٥ ± ٠/٢
شاهد دیابتی	٢٦٩/٦٦ ± ١٣/٤	٤٣/١٥٣ ± ٤/٢
دیابتی تیمار با ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاوونوئید	١٨٨/٣٣ ± ١٢/٠٥	١٩/٩٣ ± ١/٠٣
دیابتی تیمار با ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاوونوئید	١٤٩ ± ١١/٠٨	٩/٦٢ ± ١/٢٣
سطح معنی‌داری	٠/٠٠٩	٠/٠٠١



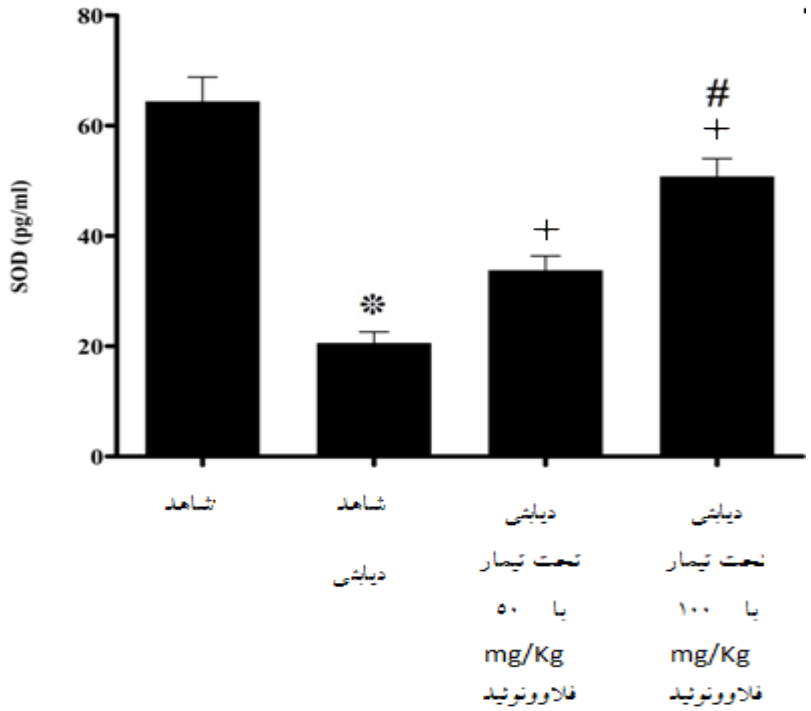
نمودار ۱- میانگین میزان Bax در گروه‌های مورد مطالعه. ❋ ، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد، +، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد دیابتی، #، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاوونوئید



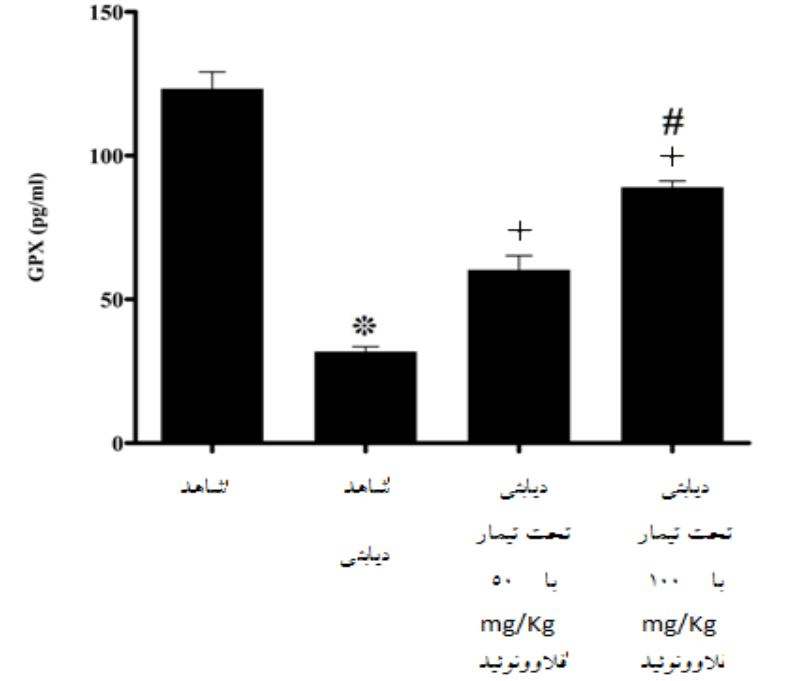
نمودار ۲- میانگین میزان Bcl_2 در گروه‌های مورد مطالعه. ❊ ، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد، +، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد دیابتی، #، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاوونوئید



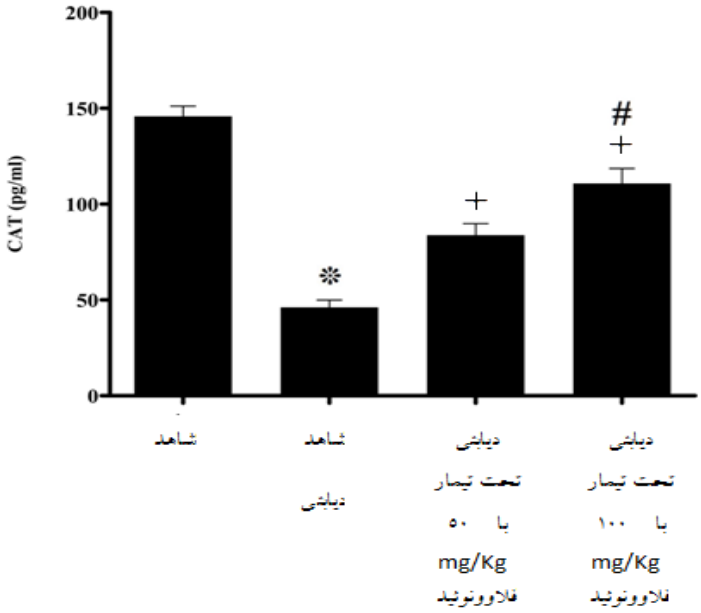
نمودار ۳- میانگین میزان MDA در گروه‌های مورد مطالعه، ❊ ، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد، + ، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد دیابتی، #، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاوونوئید



نمودار ٤- میانگین میزان آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (SOD) در گروه‌های مورد مطالعه، ❊. ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد، +، ($p < ۰/۰۵$)در مقایسه با گروه شاهد دیابتی، #، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی-گرم/کیلوگرم فلاوونوئید



نمودار ٥- میانگین میزان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در گروه‌های مورد مطالعه،❊. ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد، + ، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد دیابتی، #، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاوونوئید



نمودار ٦- میانگین میزان آنزیم گلوتاتیون کاتالاز (CAT) در گروه‌های مورد مطالعه، ❊. ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد، + ، ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه شاهد دیابتی، #. ($p < ۰/۰۵$) در مقایسه با گروه تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاوونوئید

بحث

این پژوهش به بررسی اثر فلاونوئید تام اندام هوایی گیاه حرا بر میزان Bax، Bcl-2 و شاخص‌های استرس‌اکسیداتیو اسپرم اپی‌دیدیمی موش‌های صحرایی دیابت نوع یک پرداخت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با موش-های سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نسبت Bax/Bcl-2 در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی افزایش یافت. یافته-های پیشین نشان داده شده است دیابت ملیتوس سبب تغییرات ملکولی در اسپرم می‌شود و بر کیفیت و عملکرد اسپرم موثر است. علاوه بر این، با افزایش استرس‌اکسیداتیو باعث آسیب رساندن به هسته و DNA میتوکندری اسپرم می‌شود. از سوی دیگر مشخص شده است دیابت ملیتوس با القاء آپوپتوریس در رده سلول‌های اسپرماتوژنیک سبب اختلال در اسپرماتوژنز و نیز با کاهش سطح سرمی تستوسترون و کاهش پارامترهای عملکردی اسپرم سبب اختلال در باروری می‌شود (۱۸). مشخص شده است دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوتوسین سبب پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش تولید ROS در اپی-دیدیم و میتوکندری اسپرم می‌شود. همچنین با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در عملکرد بیضه و فرایند اسپرماتوژنز موثر است. علاوه بر این مشخص شده است دیابت ملیتوس با تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌طور قابل توجهی سبب آسیب DNA اسپرم و بروز اسپرم‌های غیر طبیعی می‌شود (۳۳). تحقیقات نشان داده است دیابت با ایجاد استرس-اکسیداتیو سبب کاهش غلظت اسپرم در ناحیه اپی-دیدیم خلفی می‌شود همچنین هیپرگلیسمی ناشی از دیابت سبب اختلال در متابولیسم لیپیدها و لیپید پراکسیداسیون در اسپرم می‌شود (۲۳). مطالعه دیگری نشان داده است افزایش سطح لیپید پراکسیداسیون و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در اسپرم

موش‌های صحرایی دیابتی یک هفته تا سه ماه پس از القاء دیابت تجربی سبب کاهش کیفیت اسپرم، کاهش مایع سمینال و کاهش سطح ATP می‌شود (۲و ۳). نتایج پژوهشی نشان داده است در مبتلایات به دیابت نوع ۱ و ۲ اختلال در قابلیت انتقال غشای میتوکندری و فعال شدن کاسپاز ۳ سبب القاء اپوپتوزیس در اسپرم می‌شود. از سوی دیگر افزایش ROS درون سلول سبب آسیب DNA و شروع سیگنال آپوپتوز در اسپرم می‌شود (۲۹). محققین گزارش کردند شاخص‌های آپوپتوزی در سلول های زایای بیضه به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. از سوی دیگر مشخص شده است در اسپرم موش‌های دیابتی بیان ژن BAX، کاسپاز ۳ و فسفو-JNK افزایش می‌یابد (۱۷).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم فلاونوئید در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت همچنین میزان پراکسیداسیون لیپیدی و نسبت Bax/Bcl-2 در اسپرم موش‌های صحرایی دیابتی کاهش یافت. طبق تحقیقات انجام شده فلاونوئیدهای موجود در برگ گیاه حرا قادر به حذف هیدروژن پراکسید بوده و در دفاع سلولی علیه استرس‌اکسیداتیو القاء شده توسط رادیکال‌های آزاد نقش اصلی را بر عهده دارد. همچنین با حذف رادیکال‌های آزاد می‌توانند سبب افزایش قدرت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی درون سلولی شوند (۱). طبق یافته‌های اخیر، ترکیبات پلی-فنولی و فلاونوئیدی گیاه حرا به‌عنوان یک آنتی-اکسیدان قوی و ضد التهاب در سیستم‌های بیولوژیک بدن عمل می‌کند (۳۷). مطالعات نشان داده است عصاره آبی برگ گیاه حرا با خاصیت آنتی‌اکسیدانی توانسته است سطح رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از دیابت را کاهش داده و از آسیب بافتی جلوگیری نماید. همچنین مشخص شده است عصاره برگ گیاه حرا با مهار برهم‌کنش‌های شیمیایی رادیکال‌های آزاد به‌عنوان آغاز کننده استرس-اکسیداتیو، با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و سرکوب روند التهاب، اثرات محافظتی خود را بر بافت کبد اعمال می‌کند (۱۲) نظر به این‌که فلاونوئیدها یکی از بیشترین پلی‌فنول‌های گیاه حرا است (۳۳)، این ترکیبات می‌توانند سلول‌ها را در برابر تخلیه گلوتاتیون احیاء، با افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، محافظت نماید (۵). در پژوهش دیگری مشخص شد ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در برگ گیاه حرا با خواص مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد می-توانند بافت‌ها را در برابر استرس‌اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند (۱٤). همچنین مشخص شده است عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه حرا دارای اثرات هیپوگلیسمیک در موش‌های صحرایی دیابتی است و گزارش شده است عصاره برگ گیاه حرا سبب افزایش مصرف گلوکز و یا کاهش آزادسازی قندها از منابع ذخیره‌ای می‌شود (۱۰). تحقیقات نشان داده است فلاونوئیدها سبب مهار آپوپتوز، افزایش ترشح انسولین از طریق هیپرتروفی سلول‌های بتا پانکراس، بهبود هیپرگلیسمی از طریق تنظیم متابولیسم گلوکز در سلول‌های هپاتوسیتی، کاهش مقاومت به انسولین و کاهش التهاب و استرس‌اکسیداتیو می‌شوند (٤). تحقیقات پیشین گویای اثر فلاونوئیدها بر کاهش استرس-اکسیداتیو و آپوپتوز در موش‌های دیابتی مبتلا به نفروپاتی است (۱۱). در پژوهشی که به بررسی اثر فلاونوئید بر آپوپتوزیس و استرس‌اکسیداتیو در بیضه موش‌های صحرایی دیابتی پرداخت، مشخص شده است درمان موش‌های دیابتی با فلاونوئید به‌طور قابل توجهی سبب کاهش میزان مالون دی‌آلدئید و افزایش

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در بافت بیضه می‌شود (۱۵). پژوهشی نشان داد فلاونوئیدها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی اسپرم سبب افزایش میزان بقاء اسپرم می‌شوند و نیز می‌تواند جهت حفظ پارامترهای حرکتی اسپرم و عملکرد تولید مثل در موش‌های صحرایی دیابتی مفید باشند (۱۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت تیمار موش‌های صحرایی دیابتی با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا می‌تواند به‌صورت وابسته به دوز مصرفی تاثیر مثبتی بر کاهش استرس‌اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی اسپرم داشته باشد. همچنین به‌صورت وابسته به دوز مصرفی موجب کاهش آپوپتوزیس در اسپرم‌های موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. از این‌رو می‌توان به نقش فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در کاهش بخشی از آسیب‌های اسپرم و افزایش باروری در مبتلایان به دیابت اشاره کرد.

منابع

1. Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, 196:67-76.

2. Amaral S., Moreno A.J., Santos MS., Seiça R., Ramalho-Santos J. 2006. Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes. *Theriogenology*. 66(9): 2056-2067.

3. Arenas-Ríos E., Rosado García A., Cortés-Barberena E., Königsberg M., Arteaga-Silva M., Rodríguez-Tobón A. 2016. Reactive oxygen species production and antioxidant enzyme activity during epididymal sperm maturation in *Corynorhinus mexicanus* rats. *Reproductive Biology*, 16(1):78-86.

4. Babu P.V., Liu D., Gilbert E.R. 2013. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(11):1777-1789.

5. Chu Y., Sun J., Wu X., Liu R.H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23): 6910-6916.

6. Davì G., Falco A., Patrono C. 2005. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxidants and Redox Signaling*, 7(1-2):256-268.

7. De Lamirande E., O'Flaherty C. 2008. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. *Biochim Biophys Acta*,. 1784(1):106-115.

8. Ding G. L., Liu Y., Liu M. E., Pan J.X., Guo M.X., Sheng J.Z., Huang H.F. 2015. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. *Asian Journal of Andrology*, 17(6):948-953.

9. Fathi-Moghaddam H., Mokhtari M., Kamaei L., Ahangar-pour A. 2011. Effects of *Avicennia marina* leaves aqueous and hydro alcoholic extract on streptozotocin-induced diabetic male rats. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 10(4):245-254.

10. Franco R., Sánchez-Olea R., Reyes-Reyes E.M., Panayiotidis M.I., 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trois. *Mutation Research*, 674(1-2):3-22.

11. Gholami M., Mirazi N. 2016. Study of hepato protective effects of *Avicennia marina* hydroethanolic leaves extract in male rats induced with carbone tetrachloride. *Armaghane Danesh*. 20(10):858-872.

12. Gomes I.B., Porto M.L., Santos M.C., Campagnaro B.P., Pereira T.M., Meyrelles S.S. 2014. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. *Lipids in Health and Diseases*, 13:184.

13. Ighodaro O.M., Adeosun A.M., Akinloye O.A. 2017. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina (Kaunas).* 53(6):365-374.

14. Kanter M., Aktas C., Erboga M. 2012. Protective effects of quercetin against apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Food Chemistry and Toxicology*, 50(3-4):719-725.

15. Khaki A., Fathiazad F., Nouri M., Khaki A., Ghanbari Z., Ghanbari M. 2011. Anti-oxidative effect of Citro flavonoids on spermatogenesis in rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(6):721-725.

16. Khaki A., Fathiazad F., Nouri M., Khaki A., Maleki N.A., Khamnei H.J. 2010. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*, 24(9):1285-1291.

17. Koh P.O. 2007. Streptozotocin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes. *Journal of Veterinary Science*, 69(9):969-971.

18. La Vignera S., Condorelli R., Vicari E., D'Agata R., Calogero A.E. 2012. Diabetes mellitus and sperm parameters. *Journal of Andrology*, 33(2):145-153.

19. Laulier C., Lopez B.S. 2012. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. *Mutation Research*, 751(2):247-257.

20. Lemelman MB, Letourneau L, Greeley SAW. 2018 Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management. *Clinical Perinatology*, 45(1): 41-59.

21. Lee J., Ma K., Moulik M., Yechoor V. 2018. Untimely oxidative stress in β-cells leads to diabetes - Role of circadian clock in β-cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 119:69-74.

22. Maes M.E., Schlamp C.L., Nickells R.W. 2017. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells. Progress in *Retinal* and *Eye Research*, 57: 1-25.

23. Navarro-Casado L., Juncos-Tobarra M. A., Cháfer-Rudilla M., de Onzoño L. Í., Blázquez-Cabrera J.A., Miralles-García J. M., 2010. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity, Study in rats. *Journal of Andrology*, 31(6):584-592.

24. O'Flaherty C., de Lamirande E., Gagnon C. 2006. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*. 41(4):528-540

25. Pergialiotis V., Prodromidou A., Frountzas M., Korou L.M., Vlachos G.D., Perrea D. 2016. Diabetes mellitus and functional sperm characteristics: A meta-analysis of observational studies. *J Diabetes Complications*. 30(6):1167-1176.

26. Purdy P.H., Ericsson S.A., Dodson R.E., Sternes K.L., Garner D.L. 2004. Effects of the flavonoids, silibinin and catechin, on the motility of extended cooled caprine sperm. *Small Ruminant Research*, 55(1-3):239-243.

27. Renault T.T., Dejean L.M., Manon S. 2017. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161(Pt B):201-210.

28. Rochette L., Zeller M., Cottin Y., Vergely C. 2014. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(9):2709-2729.

29. Roessner C., Paasch U., Kratzsch J., Glander H.J., Grunewald S. 2012. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reproductive BioMedicine Online*, 25(3): 292-299.

30. Saenger P., West P.W. 2018. Phenotypic variation of the mangrove species *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. From seven provenances around Australia. *Aquatic Botany*, 149:28-32.

congener (BDE-47) on growth and antioxidative enzymes of two mangrove plant species, *Kandelia obovata* and *Avicennia marina*, in South China. *Marine Pollution Bulletin*, 85(2):376-84.

37. Wright C., Milne S., Leeson H. 2014. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 28(6):684-703.

38. Zamani Gandomani M., Forouzandeh Malati E. 2014. Antinociceptive effect of extract of mangrove (*Avicennia marina*) in male rats. *MJTUOMS*, 36(1):34-39.

39. Zamani Gandomani M., Forouzandeh Molaali E., Zamani Gandomani Z., Madani H., Jamal Moshtaghian S. 2012. Evaluation of Anti-inflammatory effect of hydroalcoholic extract of mangrove (*Avicennia marina*) leaves in male rats. *MJTUOMS*, 34(4):80-85.

31. Sharaf M., El-Ansari M. A., Saleh N. A. M. 2000. New flavonoids from *Avicennia marina*. *Fitoterapia*, 71(3):274-277.

32. Shrilatha B., Muralidhara. A. 2007. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reproductive Toxicology*, 23(4):578-587.

33. Soleimani Z., Mirazi N. 2015. The Effect of *Avicennia marina* hydroethanolic leaf extract on testes tissue and spermatogenesis in male rats induced with carbon tetrachloride. *Armaghane Danesh*, 20(8):677-688.

34. Thatoi H.N., Patra J.K., Das S.K. 2014. Free radical scavenging and antioxidant potential of mangrove plants: a review. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(3): 561-579.

35. Wang T., Li Q., Bi K. 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *AJPS*, 13(1):12-23.

36. Wang Y., Zhu H., Yee Tam N.F. 2014. Effect of a polybrominated diphenyl ether

The Effect of *Avicennia marina* Flavonoids on Bax, Bcl-2 and Stress Oxidation Indicators of Epididymis Sperm in Type 1 Diabetic Rats

Raheleh Rahbarian*

Department of Biology, College of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

Abstract

Diabetes affects the reproductive system and causes fertility disorders. Regarding the anti-oxidant and hypoglycemic properties of *A. marina*, the aim of this study was to determine the effect of total flavonoid contents on Bax, Bcl-2 level, and stress-oxidative stress indices of epididymis sperm in type 1 diabetic rats. In this experimental study, 32 male Wistar rats were divided into control, control diabetic, and two diabetic treated groups. The last two groups received 50 and 100 mg / kg Flavonoids in *A. marina* leaf for 30 days. At the end of the treatment period, sperms were extracted from the epididymis. Then Bax, Bcl-2, malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and HOdG levels in sperm samples also FBS were measured by ELISA method. According to the results, the levels of Bcl-2, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in sperm samples of diabetic rats treated with 50 and 100 mg / kg flavonoid concentrations of *A. marina* in Comparison with the control group, the diabetic was significantly increased, and the Bax, malondialdehyde and HOdG levels decreased significantly, Depending on the injectable dose ($p < 0.05$). Flavonoid administration of *A. marina* leaves decreased apoptosis and stress-oxidative stress in spermatozoa of type I diabetic rats.

Keywords: Diabetes, *A. marina*, Apoptosis, Sperm, Flavonoid.