فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۱، جلد ۱۱، شماره ۲، بهار۹۷، صفحه ۳۷ تا ۴۶

اثرات عصاره هیدروالکلی برگ شلغم بر تغییرات سیکل استروس، بافت تخمدان و غلظت هورمون های جنسی استروژن و پروژسترون و در موش صحرایی ماده

بهاره نجفی[۱]، امیر اشکان مهجور[۲]، حمید صادقی[۳]
۱-دانش آموخته گروه آموزشی بیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم. ایران.
۲- گروه آموزشی پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون. ایران. amir.mahjoor@gmail.com
۳- گروه آموزشی بیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم. ایران.
تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش:۹۷/۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: شلغم و برگ آن از زمان های قدیم به عنوان غذا و دارو مورد استفاده قرار می گرفته است. این گیاه حاوی ترکیبات متفاوتی با فعالیت های بیولوژیک مختلف است. در این مطالعه اثرات برگ شلغم بر روی غلظت سرمی پروژسترون، استروژن و گنادوتروپین ها و فولیکول های پری موردیال، اولیه، ثانویه، گراف و جسم زرد تخمدان موش صحرایی مورد بررسی قرار می گیرد.

روش کار: برای انجام مطالعه از چهل و پنج سر موش صحرایی ماده بالغ ۸۰-۹۰ روزه از نژاد ویستار استفاده شد. موش ها به صورت تصادفی در پنج گروه نه تایی شامل گروه شاهد و کنترل که هیچ گونه عصاره دریافت نمی کردند و گروه های تجربی کم، متوسط و زیاد نیزکه به ترتیب ۵۰، ۱۰۰ و۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره شلغم را به مدت چهارده روز از طریق دهانی دریافت می-کردند، تقسیم بندی , در پایان روز چهاردهم ار تمامی گروه ها نمونه خونی اخذ شده و غلظت سرمی LH, FSH، پروژسترون و استروژن اندازه گیری شدند. هم چنین با جدا کردن تخمدان تعداد فولیکول های پره آنترال، اولیه، ثانویه، گراف و جسم زرد شمارش گردید.

یافته ها: اندازه گیری هورمونی نشان داد که میزان LH در گروه های تجربی با مصرف ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم برگ شلغم کاهش معنی داری را نشان داد($p\geq0/05$). هم چنین نتایج نشان داد که دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم باعث کاهش معنی دار استروژن و دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم باعث کاهش معنی دار میزان پروژسترون شده است($p\geq0/05$). ضمن این که عصاره هیدروالکلی برگ شلغم افزایش معنی دار تعداد فولیکول های اولیه در تخمدان داشته است($p\geq0/05$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج مشخص شد که عصاره هیدروالکلی برگ شلغم باعث کاهش معنی دار میزان LH، پروژسترون و استروژن سرم شده و بر FSH سرم بی تاثیر بود. در ضمن عصاره برگ شلغم باعث افزایش افزایش معنی دار تعداد فولیکول های اولیه در تخمدان شده است.

واژه های کلیدی: برگ شلغم، پروژسترون، استروژن، گنادوتروپین، موش صحرایی.

مقدمه

امروزه علاقه مندی به شناخت واستفاده از گیاهان دارویی در دنیا گسترش روزافزونی یافته است. گیاهان در طول زمان جایگاه خود را به عنوان دارو در زندگی انسان تثبیت کرده اند. مشکلات هورمونی جنسی مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. هورمون درمانی نظیر استروژن درمانی با استفاده از هورمون های مصنوعی خطر ابتلای به سرطان سینه و آدنوکارسینومای رحم را افزایش می دهد(۲). برخی ازمحققین تأکید نموده اند که ترکیبات گیاهی حاوی فیتواستروژن ها با فرمول طبیعی، نسبت به داروهای شیمیایی عوارض کمتری به خصوص از نظر ایجاد سرطان سینه و رحم درانسان ایجاد می نمایند(۲۳). شلغم(Brassica rapa L. var rapl) از قدیمی ترین

گیاهانی است که توسط انسان کشت می شده است(۱۴). این گیاه قرن ها پیش در اروپا کشت شده و از آن جا به خاور میانه و آسیای شرقی گسترش یافت. شلغم را می-توان تا ماه ها پس از برداشت نگهداری کرد و این خصوصیت باعث اهمیت بیشتر این گیاه شده است(۵). اندام های مختلف شلغم مانند ریشه، برگ و ساقه آن در طب سنتی برای درمان بیماری های مختلف مانند دیابت مورد استفاده قرار می گیرد(۱۱). مشخص گردیده که مصرف گیاهان خوراکی مانند شلغم از بسیاری از بیماری‌های مزمن جلوگیری می کند(۵). این مواد محتوی میزان بالای مواد بیواکتیو غیر خوراکی هستند که برای سلامتی مفید می باشند. این خصوصیت بیشتر به دلیل خواص آنتی اکسیدانی این مواد به خصوص ترکیبات فنولی و اسید های ارگانیک می باشد(۲۹). برگ شلغم به رنگ سبز کم رنگ با ضخامت نازک و در بسیاری از مناطق جهان استفاده خوراکی می شود(۵). برگ ها نه تنها از نظر وجود ویتامین ها غنی هستند، بلکه حاوی میزان بالای مواد مختلف با خواص بیولوژیک هستند که اثرات دارویی متنوعی برای آن ها بیان شده است(۳۱، ۲۹). مطالعات وسیعی بر روی فنیل پروپانوئیدها، اجزا فرار و آلوزیم های موجود در برگ شلغم صورت گرفته است(۵). فرناندز وهمکاران بیان کرده اند که برگ شلغم حاوی چهارده اسید فنولیک و شش اسید ارگانیک می باشد. هم چنین این محققین بیان نمودند که میزان فلاوونوئیدها و اسیدهای ارگانیک در برگ و ساقه شلغم بیشتر از ریشه آن می باشد(۵). برگ های شلغم حاوی فلاوونوئیدهای مختلفی مانند کامپفرول، ایزورامنتین، لوتئین، کورستین گلیکوزید، آلکالوئیدهای ایندولی، مشتقات فنیل پروپانوئید مانند اسید سیناپیک و استرول های گلیکوزیدی(۲۵) و پلی فنل های مختلفی مانند اسید سیناپیک است(۱۲). مطالعات مختلف مشخص نموده که عصاره شلغم دارای خواص محافظتی از کلیه وکبد بوده و اثرات ضدالتهابی ضد سرطانی دارد(۱۰). علاوه بر این برگ شلغم دارای قدرت کاهش لیپیدهای و کاهش قند خون و محافظت از کلیه در موش های دیابتیک است(۸). برگ شلغم حاوی فلاوونوئیدهای مختلفی مانند کامپفرول، کوئرستین و لوتئین می باشد(۲۵). تعدادی از فلاوونوئیدهای موجود در برگ شلغم مانند کامپفرول، ایزو فلاوون و لوتئین خواص فیتواستروژنی دارند(۶). با توجه به آن که فیتواستروژن ها ساختاری شبیه به استرادیول دارند، می-توانند به عنوان استروژن و آنتی استروژن عمل کند. در دوزهای بالاتر این مواد خاصیت آنتی استروژنی داشته و باعث کاهش استروژن در زمان مصرف دوزهای بالاتر می شود(۳۳). این ترکیبات از نظر ساختمان و عمل، شبیه ۱۷ بتا استرول می باشند و اثراتی شبیه استروژن را ایجاد می کنند. فیتواستروژن ها به خوبی استروژن ها قادرند به رسپتور آن ها باند شوند و با اتصال به رسپتورهای استروژنی در هیپوفیز قدامی از طریق اعمال کنترل فیدبک منفی، با کاهش سطح هورمون FSH محرک ترشح استروژن باشد. ملیحه زمانی و همکاران(۲۰۱۲) بیان کرده اند که فیتواستروژن ها می توانند مانع اتصال استروژن به فیتوپروتئین های سرم شوند. هم چنین واکنش متقابل بین فلاونوئیدها با فیتوپروتئین ها نیز بر دسترسی سلول ها به استروژن تأثیر می گذارند، بنابراین سطح استروژن سرم کاهش می یابد(۱۷). تیسوال و جفرسون(۲۰۱۰) بیان می دارند که فیتواسترول ها می-توانند باعث کاهش FSH و LH شوند(۲۴). با توجه به تنوع بالای مواد بیولوژیک موجود دربرگ شلغم می‌توان فعالیت های مختلف بیولوژیک و گاه متضادی را مشاهده نمود(۸). علی رغم این که شلغم در دنیا به طرز گسترده کشت و مصرف می شود و نیز مصرف خوراکی گسترده برگ این گیاه در کشورهای مختلف، تحقیقی بر اثرات این گیاه بر روی فاکتورهای تولید مثلی صورت گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه آزمایشگاهی با رعایت کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل های آزمایشگاهی کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی بر اساس قوانین بین المللی انجام و مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم قرار گرفت. به منظور انجام این مطالعه از چهل و پنج سر موش صحرایی ماده بالغ ۸۰-۹۰ روزه نژاد ویستار استفاده شد. درطول دوره مطالعه همه حیوانات از آب و غذای یکسان و بدون محدودیت برخوردار بوده، با شرایط نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی و در درجه حرارت ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰-۵۵ درصد نگهداری شدند. حیوانات به مدت ۲ هفته قبل از شروع آزمایش، جهت سازگاری با محیط در حیوانخانه دانشگاه آزاد جهرم نگهداری و برای همسان سازی سیکل استروس از روش مارکوندس و همکاران(۲۰۰۲) استفاده شد، به این صورت که برای یکسان سازی سیکل ابتدا تزریق ۱۰۰ میکروگرم استرادیول والرات در ۰/۲ میلی لیتر روغن زیتون حل و عضلانی و بعد از ۴۲ ساعت ۵۰ میکروگرم پروژسترون به صورت عضلانی تزریق گردید(۱۸). موش‌ها به صورت تصادفی در پنج گروه نه تایی به شرح زیر تقسیم بندی شدند. گروه شاهد و کنترل هیچ گونه عصاره ای دریافت نمی کردند وآب و غذا به صورت آزاد در اختیارشان قرار داده می شد. به گروه شاهد تنها حلال دارو(آب مقطر) از طریق گاواژ خورانده می‌شود. گروه تجربی یک، دو و سه نیز علاوه بر آب و غذا به ترتیب ۱۰۰،۲۰۰ و ۵۰ میلی گرم عصاره هیدرو الکلی شلغم را به مدت چهارده روز از طریق دهانی دریافت می‌کردند(۳۱). به منظور مشخص کردن هم سیکل بودن موش های صحرایی قبل از تشریح و خون گیری از تمام آن ها اسمیر واژنی برروی لام تهیه و با رنگ گیمسای رقیق شده ۱ به ۲۲ رنگ آمیزی و جهت شناسایی سیکل جنسی موش ها، در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. سیکل ها بر اساس نسبت میان جمعیت سلولی-های اپیتلیالی، شاخی و لوکوسیت ها مشخص گردید. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد در فاز استروس موش-ها هم سیکل شده اند. تهیه عصاره: برگ شلغم از مزارع اطراف جهرم تهیه گردید. پس از تائید توسط متخصصان گیاه شناسی، برگ ها خشک و سپس پودر شدند. هزار گرم از پودر به دست آمده در دستگاه پرکولاتور ریخته و برای خارج نمودن ترکیبات قطبی و غیرقطبی، مقدار ۳ لیتر متانول ۷۰ درصد به پودراضافه شده، سپس از ۷۲ ساعت، عصاره به وسیله کاغذ صافی صاف و حلال با استفاده از دستگاه روتاری خارج گردید. بعداز خروج حلال از عصاره، ترکیب به دست آمده برای خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده و عصاره تغلیظ شده پس از خشک شدن کامل تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند(۲۳). برای تهیه غلظت های مورد نظر از سرم فیزیولوژیک استفاده و حیوانات پس از گاواژ در روز چهاردهم به مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگهداری شدند. سپس داخل دسیکاتور توسط دی اتیل اتر بیهوش و از قلب آن-ها توسط سورنگ های هپارینه خون‌گیری به عمل می-آمد. نمونه ها پس ازنگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به منظور لخته شدن خون، با دور۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم سریعاً جدا و در دمای ۳۰ - درجه سانتی گراد برای سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی نگهداری شدند. پس از بیهوشی موش ها کالبد گشایی و تخمدان آن ها در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ قرار داده شده و به آزمایشگاه هیستوپاتولوژی ارسال و از نمونه ها به روش معمول اسلایدهای بافتی ۵ میکرونی تهیه شده و به روش هماتوکسیلین-ائوزین تهیه شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. فولیکول اولیه، فولیکول ثانویه،

فولیکول گراف و آترتیک و جسم زرد با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ با استفاده از دستگاه سل کانتر و مشاهده حداقل سه فیلد در هر مقطع و برآورد میانگین آن برای هرنمونه به دست آمد(۲۳). غلظت هورمون های استروژن و پروژسترون با استفاده از کیت مونوبایند آلمان LH ,FSH با استفاده از کیت پادتن طب به روش الیزا در آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی جهرم اندازه گیری و داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و از طریق آزمون تجزیه و تحلیل واریانس و تست تعقیبی توکی وتست دانکن مورد تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

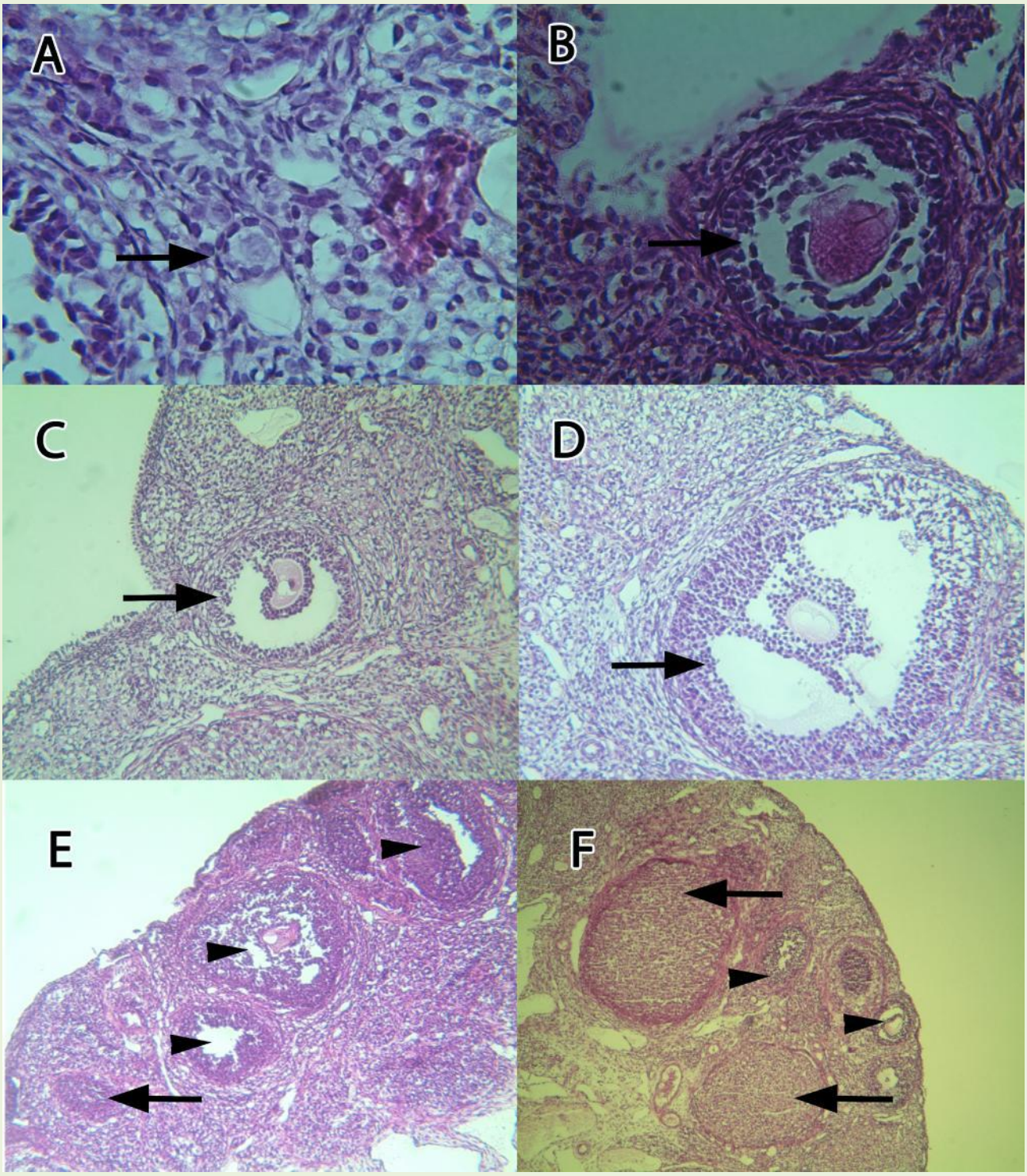
نتایج به دست آمده از مطالعه اثرات عصاره هیدروالکلی برگ شلغم بر تغییرات وزن، سیکل استروس، غلظت هورمون های جنسی استروژن و پروژسترون نشان داد که تغییری از نظر وزنی در موش ها در روز کشتار مشاهده نشد. اندازه گیری هورمونی نیز نشان داد که میزان LH در گروه های تجربی با مصرف ۵۰،۱۰۰،۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم برگ شلغم کاهش معنی داری را نشان داد($p\geq ۰/۰۵$). در این مطالعه تغییر معنی داری بین گروه های مختلف در میزان FSH مشاهده نگردید($p\geq ۰/۰۵$). مقایسه نتایج هم چنین نشان داد که دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم باعث کاهش معتی دار استروژن نسبت به گروه کنترل و گروه ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم برگ شلغم باعث کاهش میزان استروژن نسبت به گروه شم شده است($p\geq ۰/۰۵$). هم چنین گروه با دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار میزان پروژسترون نشان داده است($p\geq ۰/۰۵$). مقایسه گروه‌های مختلف از نظر پارامترهای مورد بررسی در جدول یک آمده است.

جدول ۱- مقایسه وزن روز اول و کشتار، فولیکول های اولیه، ثانویه و پری موردیال و میزان هورمون استروژن، پروژسترون LH و FSH در گروهای مورد مطالعه

	کنترل	شم	کم	متوسط	زیاد
وزن روز اول(گرم)	$۱۵۵/۰۶ \pm ۵/۴۰^{a}$	$۱۴۳/۴۴ \pm ۲/۹۷^{a}$	$۱۵۰/۴۴ \pm ۴/۰۳^{a}$	$۱۴۴/۲۸ \pm ۶/۳۴^{a}$	$۱۴۶/۲۸ \pm ۴/۹۵^{a}$
وزن روز کشتار(گرم)	$۱۶۰/۸۸ \pm ۵/۹۱^{a}$	$۱۶۲/۱۱ \pm ۲/۵۱^{a}$	$۱۶۱/۴۴ \pm ۳/۸۰^{a}$	$۱۶۵/۰۸ \pm ۴/۰۷^{a}$	$۱۷۱/۲۸ \pm ۳/۴۱^{a}$
فولیکول اولیه	$۶/۶۶ \pm ۲/۱۵^{ab}$	$۹/۵۵ \pm ۲/۹۲^{b}$	$۱/۳۳ \pm ۲/۳۲^{b}$	$۶/۲۸ \pm ۲/۳۹^{ab}$	$۲/۱۴ \pm ۱/۰۱^{a}$
فولیکول ثانویه	$۴/۷۷ \pm ۱/۱۹^{a}$	$۵/۴۴ \pm ۱/۱۶^{a}$	$۴/۴۴ \pm ۰/۸۰^{a}$	$۳/۵۷ \pm ۰/۹۴^{a}$	$۴/۲۸ \pm ۰/۸۶^{a}$
فولیکول پری موردیال	$۱۰/۷۷ \pm ۱/۴۲^{a}$	$۱۳/۷۷ \pm ۲/۶۹^{a}$	$۱۳/۷۷ \pm ۱/۴۱^{a}$	$۹/۲۸ \pm ۱/۶۷^{a}$	$۱۴ \pm ۲/۱۶^{a}$
فولیکول آترزی	$۱۵/۴۴ \pm ۲/۳۸^{a}$	$۱۴/۵۵ \pm ۲/۴۵^{a}$	$۱۹/۷۷ \pm ۳/۸۱^{a}$	$۱۶/۰۴ \pm ۵/۶۸^{a}$	$۱۳/۵۷ \pm ۳/۳۵^{a}$
جسم زرد	$۱۲/۶۵ \pm ۱/۴۰^{b}$	$۱۲/۴۴ \pm ۱/۴۴^{ab}$	$۸/۵۵ \pm ۱/۳۰^{a}$	$۱۱/۷۱ \pm ۲/۵۹^{ab}$	$۱۱/۴۲ \pm ۲/۲۱^{ab}$
LH (ng/ml)	$۰/۱۲ \pm ۰/۰۰۳^{a}$	$۰/۱۰ \pm ۰/۰۰۷^{a}$	$۰/۱۰ \pm ۰/۰۰۴^{a}$	$۰/۱۹ \pm ۰/۰۰۷^{b}$	$۰/۲۱ \pm ۰/۰۲^{b}$
FSH(ng/ml)	$۰/۳۸ \pm ۰/۰۵۸^{a}$	$۰/۴۱ \pm ۰/۰۳۶^{a}$	$۰/۵۷ \pm ۰/۰۹۱^{a}$	$۰/۴۷ \pm ۰/۰۷۲^{a}$	$۰/۳۸ \pm ۰/۰۷۳^{a}$
استروژن(ng/ml)	$۶۸/۳۹ \pm ۴/۹۲^{a}$	$۶۹/۲۸ \pm ۱/۶۷^{a}$	$۷۹/۹۳ \pm ۵/۰۷^{ab}$	$۷۸/۳۹ \pm ۳/۵۳^{ab}$	$۹۰/۶۸ \pm ۶/۱۰^{b}$
پروژسترون(ng/ml)	$۱۲/۳۱ \pm ۳/۲۴^{ab}$	$۱۳/۲۱ \pm ۳/۸۷^{ab}$	$۴/۴۶ \pm ۱/۵۵^{a}$	$۱۰/۷۶ \pm ۴/۰۶^{ab}$	$۱۷/۰۵ \pm ۲/۰۲^{b}$

نتایج ارزیابی بافتی

در مطالعه حاضر تغییر معنی داری در تعداد فولیکول های پری موردیال، فولیکول ثانویه، فولیکول گراف به دنبال مصرف عصاره هیدروالکلی برگ شلغم مشاهده نشد($p\geq ۰/۰۵$). ضمن این که عصاره برگ شلغم باعث افزایش معنی دار تعداد فولیکول های اولیه تخمدان در گروه های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم نسبت به گروه کنترل شده بود($p\geq ۰/۰۵$). هم چنین تعداد جسم زرد در گروه ۵۰ میلی گرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد(شکل ۱).



شکل ۱- اثرغلظت های متفاوت عصاره هیدروالکلی برگ شلغم بر بافت تخمدان

a : بافت تخمدان در گروه کنترل: فولیکول پری موردیال. به پوشیده شدن اووسیت توسط یک لایه سلول سنگفرشی توجه شود.

b: بافت تخمدان در گروه ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم:فولیکول اولیه.

c : بافت تخمدان درگروه ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم: پیکان نشان دهنده فولیکول ثانویه می باشد.

d : بافت تخمدان در گروه ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم: فولیکول گراف.

e : بافت تخمدان در گروه ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم. پیکان نشان دهنده فولیکول آنرتیک و سر پیکان ها نشان دهنده فولیکول گراف می باشد.

f: بافت تخمدان در گروه ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ شلغم. پیکان های بزرگ جسم زرد و سر پیکان ها فولیکول ها را نمایش می-دهد.

بحث ونتیجه گیری

با توجه به تنوع بالای مواد بیولوژیک موجود دربرگ شلغم می توان فعالیت های مختلف بیولوژیک و گاه متضادی را مشاهده کرد(۸). علی رغم این که شلغم در دنیا به صورت گسترده کشت و مصرف و در کشورهای مختلف مصرف خوراکی گسترده برگ این گیاه مشاهده می شود تحقیقی بر روی اثرات این گیاه بر روی فاکتورهای تولید مثلی در مقالات بررسی شده توسط محققین این مطالعه یافت نگردید. برگ شلغم حاوی فلاوونوئیدهای مختلفی مانند کامپفرول، کوئرستین و لوتئین می باشد(۲۵). سوار وهمکاران(۲۰۱۷) بیان کردند فلاوونوئیدهای مانند کرستین و کامپفرول می تواند در دوزهای بالاتر از ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث افزایش میزان استروژن در موش هایی که تخمدان آن ها برداشته شده است بشوند، اما در دوزهای پائین تر اثر چندانی بر روی استروژن ندارند(۳۰). نورالدین و همکاران(۲۰۱۳) بیان کرده اند که لوتئین خاصیت آنتاگونیستی پروژسترون و اگانونیستی استروژن دارد و باعث اختلال در ترشح این دو هورمون می شود. وجود لوتئین در برگ شلغم می تواند توجیه کننده کاهش پروژسترون و استروژن در این مطالعه باشد(۲۲). می توان کاهش میزان استروژن مربوط به حضور ترکیبات فیتواستروژنی در برگ شلغم بیان نمود. این ترکیبات از نظر ساختار و اثر شبیه استروژن بوده و می توانند موجب کاهش بیشتر سنتز و ترشح استروژن شوند(۹). تعدادی از فلاوونوئیدهای موجود در برگ شلغم مانند ایزو فلاوون خواص فیتواستروژنی دارند(۶،۳۳). کاهش استروژن در این مطالعه را می توان به این نکته مرتبط دانست(۳۳). کامپفرول از فلاوونوئیدهای موجود در برگ شلغم خاصیت فیتواستروژنی داشته و می تواند با اتصال به آلفا فیتو پروتئین(AFP) مانع اتصال آن به استروژن شود(۱۵). وجود میزان بالای فلاوونوئیدها با خصوصیات فیتواستروژنی می تواند از دلایل کاهش استروژن در مطالعه باشد. وی و همکاران(۲۰۱۶) بیان کرده اند که فلاوونوئیدها از طریق جلوگیری از آپوپتوز سلول های گرانولوزا باعث افزایش استروژن و پروژسترون در موش‌ها می شوند. تفاوت یافته های این محققین با مطالعه فوق می تواند مربوط به تفاوت میزان فلاوونوئیدها در این دو مطالعه و وجود ترکیبات بیواکتیو دیگر در شلغم باشد(۳۲). از دیگر دلایل کاهش استروژن در آزمایش می تواند این مطلب باشد که کاهش فعالیت آروماتاز آنزیم ضروری در سنتز استرادیول در سلول های گرانولوزا تخمدان پستانداران و تبدیل کننده آندروژن به استروژن باشد. گزارش شده که فلاوونوئیدها به خصوص لوتئولین می تواند به صورت وابسته به نور، تولید آروماتوز را در سلول های گرانولوزا مهار کند(۳۵، ۲۱). شکولنیک و همکاران(۲۰۱۶) اظهار می دارند که اکسیدان های فعال موجود در فولیکول های تخمدانی، در قبل از تخمک گذاری برای رشد و نمو این فولیکول-ها و عمل تخمک گذاری ضروری اند و کاهش گونه-های فعال اکسیژن درتخمدان ها، از رشد فولیکول‌های تخمدانی و عمل تخمک گذاری ممانعت می نماید(۲۷). برگ شلغم غنی از اسید اگزالیک، اسکوربیک اسید می-باشد. ضمن این که برگ شلغم باعث بهبود فعالیت سیستم های آنتی اکسیدان مانند گلوتاتیون پراکسیداز و کاهش دهنده ی قند و چربی خون می گردد. در دوزهای بالا، اسکوربیک اسید باعث کاهش تبدیل کلسترول به پروگنولون می شود. هم چنین اسکوربیک اسید باعث کاهش تبدیل پروژسترون به ۱۷- هیدروپروژسترون می گردد(۴). علاوه بر این اسکوربیک اسید باعث افزایش تبدیل پروژسترون به دلتا ۴ استروئید شده که تمام این مطالب می تواند کاهش میزان پروژسترون سرم اندازه گیری شده در مطالعه فوق را بیان کند. پروژسترون در یک واکنش آنزیمی دو مرحله ای

از کلسترول تولید می شود. در مرحله اول در میتوکندری سلولها کلسترول توسط آنزیم شکننده زنجیره جانبی سیتوکروم P450 به پرگنولون تبدیل و در مرحله دوم پرگنولون به سه بتا هیدروکسی هیدروژناز تبدیل می-شود(۲۰). با توجه به وجود آنزیم مهار کننده شکننده زنجیره جانبی سیتوکروم P450 دربرگ شلغم با توجه به این که پروژسترون ذخیره نمی شود بلکه از طریق فرآیند انتشار سریعا آزاد می گردد و هم چنین باتوجه به این که برگ شلغم باعث کاهش آزادسازی کلسترول در بدن می شود که می تواند باعث کاهش میزان تبدیل کلسترول رها شده به پروژسترون شود. این فرآیند می-تواند کاهش پروژسترون در مطالعه را توجیه کند. شیمادا و همکاران(۲۰۰۵) بیان کرده اند که فلاوونوئیدهایی مانند لوتئولین می تواند در کبد از تبدیل پروژسترون به ۲۰-آلفا هیدروپروژسترون جلوگیری کرده و باعث اختلال در اندازه گیری میزان طبیعی پروژسترون و در نتیجه کاهش میزان اندازه گیری شده آن در خون گردند(۲۶). پارسیپ و همکاران(۲۰۱۳) گزارش کرده اند که فیتواستروژن ها می تواند باعث کاهش FSH شوند(۱). چنین موردی در مطالعه مشاهده نشده که می-تواند مربوط به تفاوت دوزهای فیتواستروژن در دو مطالعه یا مربوط به عملکرد سایر مواد موجود در عصاره برگ شلغم باشد. از طرف دیگر مشخص شده است که FSH تنها توسط استروئیدهای گنادی تنظیم نمی شود، بلکه فاکتورهای دیگری که از پروتئین های سلول های گرانولوزا هستند، نیز در آزاد سازی آن ها دخالت دارند(۱۶). تولید LH متعاقب فیدبک منفی ناشی از بالا رفتن پروژسترون و تاثیر آن بر محور هیپوفیز- گناد می-باشد که با توجه به کاهش میزان پروژسترون در مطالعه ما، کاهش LH قابل انتظار است(۲۰). علاوه بر این که پلی فنل های موجود در برگ شلغم نیز می تواند باعث کاهش میزان LH می شود(۵). مواد بیواکتیو دیگر موجود در برگ شلغم نیز می توانند اثرات مختلف بر هورمون های جنسی بگذارند. مشخص شده است که اپی‌ژنین موجود در برگ شلغم نیز می تواند باعث کاهش LH از طریق اثر بر نورون های گاباارژیک باشد. ایندول -۳-کربونیل نیز باعث کاهش پروژسترون، استرادیول و LH می شود(۳). در مطالعه ما افزایش فولیکول های اولیه مشاهده شد. ماهاالینگام و همکاران(۲۰۱۶) بیان کردند که فیتو استرول ها می تواند از رشد و تکامل فولیکول ها جلوگیری کنند. چنین چیزی در مطالعه ما مشاهده نشد. مطالعات دیگر نشان داده است که دوزهای بالای فیتواستروژن ها باعث تأثیرات نامطلوبی بر بسیاری از سیستم های بدنی از جمله دستگاه تولید مثلی می گذارد و باعث جلوگیری از تخمک گذاری پس از رشد حیوان می شود(۲۳). از سوی دیگر نشان داده شده است رگ زایی برای رشد و نمو فولیکول های تخمدانی اهمیت زیادی دارد. از آن جا که گونه های فعال اکسیژن نقش مهمی در تحریک رگ زایی فولیکولی دارند تخریب گونه های فعال اکسیژن توسط آنتی اکسیدان های موجود در برگ شلغم می تواند با کاهش خون رسانی به فولیکول‌های تخمدانی باعث از بین رفتن فولیکول اولیه شود. لوتئین موجود در برگ شلغم نیز خواص جلوگیری از رگ زایی در تخمدان موش صحرایی را نشان داده است. تفاوت این پژوهش با نتایج مطالعه فوق می‌تواند به علت فعالیت های فلاوونوئیدهای موجود در برگ شلغم می باشد(۱۹). شو و همکاران(۲۰۱۱) کوارستین موجود در برگ شلغم را عامل افزایش فولیکول های اولیه و ثانویه و کاهش فولیکول بالغ، جسم زرد و فولیکول آترزی شده را بیان کردند. در نتایج پژوهش حاضر افزایش تعداد فولیکول های اولیه علاوه بر اثر کوارستین، می تواند به دلیل جنیستئین موجود در برگ شلغم باشد که در طول تمایز تخمدان مانع از بین رفتن اووسیت شده و موجب کاهش مرگ اووسیت را همراه دارد را می-

دهد. با توجه به این که فولیکول پره موردیال در دوره جنینی شکل می گیرد عدم تغییر در گروه های این بررسی طبیعی به نظر می رسد(۳۴).

منابع

1.Arispe, S.A., Adams, B., Adams, T.E. (2013). Effect of phytoestrogens on basal and GnRH-induced gonadotropin secretion. Endocrinol. 219(3); 243-50

2.Cirigliano, M.1.J. (2007). Bioidentical hormone therapy: a review of the evidence. Womens Hea (Larchmt), 16(5); 600-31.

3.Farideh, Z.Z., Bagher, M., Ashraf, A., Akram, A., Kazem, M. (2010). Effects of *Chamo mile* extract onbiochemical and clinical parameters in a rat model of polycystic ovary syndrome. J Reprod Infertil, 11(3); 169–74.

4.Farnham, M.W., Lester, G.E., Hassell R. (2012). Collard, mustard and turnip greens: Effects of genotypes and leaf position on concentrations of ascorbic acid, folate, β-carotene, lutein and phylloquinone. J. of Food Com. and Analysis, 27(1); 1-7.

5.Fernandes, F., Valenta, P., Sousa, C., Jose´. Pereira, A., Seabra, R.M., Paula, B. (2010). Chemical and antioxidative assessment of dietaryturnip(*Brassica rapa* var. rapa L.). Plant Cell Rep, 30(8);1435-42.

6.Grippo, A.A., Capps, K., Rougeau, B., Gurley, B.J. (2007). Analysis of flavonoid phytoestrogens in botanical and ephedra containing dietary supplements. Ann Pharmacother, 41(9); 1375-82.

8.Hassanpour, Fard M., Naseh, G., Lotfi, N., Hosseini, S.M., Hosseini. M. (2015). Effects of aqueous extract of turnip leaf (*Brassica rapa*) in alloxan-induced diabetic rats. Avicenna J Phytomed. 5(2); 148-156.

9.Heidarifar, R., Farahani, H., Mirizadeh, M., Yousefi, A., Dolatshahi, M. (2015). The effect of hydroalcoholic extract of *Anethum graveolens* (Dill) on serum estrogen and progesterone level in female rats. Qom Uni, of Med. Sci. J, 9(5); 42-49.

10. Hong, E., Kim, G.H. (2008). Anti cancer and anti microbial activities of β-phenyl ethyl iso thio cyanate in *Brassica rapa* L. Food Sci. Technol. Res., 14; 377-382

11. Javadzadeh, SM., Pouyan, M. (2010). Medicinal plants in Qaenat. 1st eds. Mashhad , Iran: SokhanGostar, P;79-183.

12. Jiang, J., Shao, Y., Li. A., Lu. C., Zhang, Y., Wang, Y. (2013). Phenolic composition analysis and gene expression in developing seeds of yellow- and black-seeded *Brassica napus*. J Integr Plant Biol, 55(6); 537-51.

13. Jung Pyo, R., Dong Chung, K., Man-Jin, I., Hee Jeong, C. Sung Dong, L. (2012) Anti oxidant potential of ethanol extract of *Brassica rapa* L. Root. Journal of Medicinal Plants Research, 6(9); 1581-1584.

14. Khalid Saeed, M., Anjum,S., Ahmad, I. (2012). Nutritional facts and free radical scavenging activity of turnip (*Brassica rapa*) From Pakistan. WASJ, 19(3); 370-375.

15. Kitagawa, S., Nabekura, T., Takahashi. T. (2005). Structure-activity relationships of the inhibitory effects off lavonoids on P-glycoprotein - mediated transport in KB-C2 cells. Bio. Pharma, Bull., 28(12); 2274-2278.

16. Laurent, P., Becker, J.A., Valverde, O. (2005). The prolactin releasing peptide antagonizes the opioid system through its receptor, GPR10. Nat Neurosci, 8; 1735-41. 95-102.

17. Mahalingam, S., Gao, L., Gonnering, M., Helferich, W., Flaws, J.A. (2016). Equol inhibits growth, induces atresia, and inhibits steroidogenesis of mouse antral follicles in vitro. Toxicol Appl Pharmacol, 15(295); 47-55.

18. Marcondes, F., Bianchi, F., Tanno, A. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Bra. J. of Bio, 62(4A); 609-14.

19. Matthew, T. C., Yayun, L., Cynthia, B.W., Sandy, G., Benford, M., Salman, M. H. (2015) Luteolin inhibits progestin-dependent angiogenesis, stem cell-like characteristics, and growth of human breast cancer xenografts. Springerplus, 22; 4:444

20. Morshedi, M., Khaleghi, M., Azarmi, M., Mohammadzadeh, A., Gol, A. (2015). The Effect of green tea on serum concentrations of estrogen, progesterone and gonadotropins in female rats. Journal of Zanjan University of Medical Sciences, 24(102); 68-77.

21. Moshtaghi, A., Johare, H., Shariati, M., Amiri, J. (1999). Effects of dactlyfiria on serum concentration of Estrogen, progestron and gonadotropins in adult female rats. Rafsenjan Medical Journal, 9(2); 117-124.

22. Nordeen, S.K., Bona, B.J., Jones, D.N., Lambert, J.R., Jackson, T.A. (2013). Endocrine disrupting activities of the flavonoid nutraceuticals luteolin and quercet in Horm. Cancer, 4(5); 293-300.

23. Parvin Jahromi, S.H., Zahiri, S.H., Mahjoor, A.A., Ahsan Nia, N. (2012). Histopathological and stereological studies of soybean hydroalcoholic extract effects on the rat ovary. Iranian Sout Med J, 3; 161-69.

24. Patisaul, H.B., Jefferson, W. (2010). The pros and cons of phytoestrogens. Front Neuroendocrinol, 31(4); 400–419.

25. Romani, A., Vignolini, P., Isolani, L., Leri, F., Heimler, D. (2006). HPLC-DAD/MS characterization of flavonoids and hydrocinnamic derivatives in turnip top (*Brassica rapa* L. Subsp Sylvestris L). J. Agric. Food. Chem., 54; 1342–1360.

26. Shimada, H., Uchida, M., Okawara, T., Abe, S., Imamura, Y. (2005). Inhibitory effects of flavonoids on the reduction of progesterone to 20 alpha-hydroxy progesterone in rat liver. J. Steroid Biochem Mol Biol, 655-668.

27. Shkolnik, K., Tadmor, A., Ben-Dor, S., Nevo, N., Galiani, D., Dekel, N. (2016). Reactive oxygen species are in dispensable in ovulation. Proc Natl Acad Sci, 108(4); 1462-146.

28. Shu, X., Hu, X.J., Zhou, S.Y., Xu, C.L, Qiu, Q.Q., Nie, S.P. (2011). Effect of quercet in exposure during the prepubertal period on ovarian development and reproductive endocrinology of mice] Yao Xue Xue Bao., 46(9); 1051-7.

29. Sousa, C., Taveira, M., Valentão, P., Fernandes, F., Pereira, J.A., Estevinho, L. (2008). Inflorescences of Brassicacea species as source of bioactive compounds: A comparative study. Food Chem., 110; 953-961

30. Swar, G., Shailajan, S., Menon, S. (2017). Activity based evaluation of a traditional ayurvedic medicinal plant: *Saraca asoca* (Roxb.) de Wilde flowers as estrogenic agents using ovariectomized rat model. J Ethnopharmacol,195; 324-333.

31. Thakur, A.K., Chatterjee. S,S., Kumar V. (2013). Beneficial effects of *Brassica juncea* on cognitive functions in rats. Pharm Biol, 51(10); 1304-10.

32. Wei, M., Mahady, G.B., Liu, D., Zheng, Z.S., Lu, Y. (2016). Astragalin, a flavonoid from *Morus alba* (Mulberry) increases endogenous estrogen and progesterone by inhibiting ovarian granulosa cell apoptosis in an aged rat model of menopause. Molecules, 21; 21-5.

33. Yildiz, F. (2005). Phytoestrogens in functional foods. 2nd ed. Taylor and Francis Ltd,UK. P. 336.

34. Zhang, S., Wu, Y., Weng, Y., Xu, Z., Chen, W., Zheng, D. (2017). In vitro growth of mouse preantral follicles under simulated microgravity. J Vis Exp, 17; 130.

35. Zhao, E., Mu, Q. (2017). Phytoestrogen biological actions on mammalian reproductive system and cancer growth. Sci Pharm, 79; 1-20.

.

Effects of Turnip Leaf Hydro-Alcoholic Extract (*Brassica rapa*) on Oestrous Cycle, Ovarian Histology and Serum Concentrations of Estrogen, Progesterone and Gonadotropins in Female Rats

B. Najafi [1], **A. A. Mahjoor**[2], H. Sadeghi[3]

1.MSc Department of biology, Jahroom branch, Jahrroom branch, Islamic azad university,Jahroom.Iran.

2.Department of Pathology, Veterinary school ,Kzeroon branch ,Islamic azad university , Kzeroon. Iran.

amir.mahjoor@gmail.com

3.Department of biology, Jahroom branch , Jahrroom branch ,Islamic azad university, Jahroom. Iran.

Received:2018.15. 2 **Accepted: 2018.9.4**

Abstract

Inroduction & Objective: ***Brassica rapa*** **(turnip) has been cultivated and consumed worldwide for many centuries. The present article aimed to investigate the effects of turnip leaf consumption on estrogen, progesterone, FSH, LH hormones and ovarian follicles in adult female rats.**

Material and Methods: A total number of 45 female Wistar rats were randomly divided into 5 equal groups including control groups, sham group and groups receiving doses of 50, 100 and 200 mg/kg turnip leaf hydro-alcoholic extract orally. Blood samples were taken at the end of the 14th day and serum concentration of LH, FSH, estrogen, and progesterone were measured. Also the number of follicles and corpora-lutea were obtained by separating ovaries.

Results: The results illustrated that serum LH significantly decreased in groups receiving Hydro-Alcoholic Extract of turnip leaf compared to the control group.The results also indicated that estrogens serum level significantly decreased in 100 and 200 mg/kg group. Progesterone was also decreased in group receiving 50 mg/kg turnip leaf hydro-alcoholic extract. But the serum level ESH did not show any significant difference in experimental groups compared to the control group.Hydro-Alcoholic Extract of turnip leaf also caused a significant increase in primary follicles.

Conclusion: The results of the present study demonstrate that turnip leaf hydro-alcoholic extract decreases LH, progesterone, estrogens and primary follicles without any significant effect on FSH.

Keywords: Turnip leaf, Progesterone, Estrogen, Gonadotropin, Rat.