فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 27، جلد 7، شماره 4،پائیز93، صفحه 9 تا 20

تاثیر عصاره هیدرو الکلی برگ زیتون (*Olea europaea*) بر روی میزان گنادوتروپین ها ،هورمون های جنسی و مراحل ا سپرماتوژنز در موش صحرایی نر دیابتی

فاطمه معینی[1]، **مختار مختاری[2]**، اسفندیار شریفی[1]

1- کارشناس ارشد علوم جانوری، گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون. ایران.

2- دانشیار فیزیولوژی گروه زیست شناسی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون. ایران.**Mokhtar_Mokhtary@Yahoo.Com**

تاریخ دریافت:93/6/27 **تاریخ پذیرش: 93/8/10**

چکیده

مقدمه و هدف: افزایش قند خون منجر به بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در فعالیت های تولید مثلی می‌گردد. در این تحقیق تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ زیتون (*Olea europaea*) بر میزان گنادوتروپین‌ها، هورمون های جنسی و نیز تغییرات بافت شناسی بیضه در مراحل اسپرماتوژنز موش صحرایی نر دیابتی مورد بررسی قرار گرفت .

مواد وروش ها: در این مطالعه تجربی 48 سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی 250-220 گرم به طور تصادفی به 6 گروه 8 تایی تقسیم و به مدت 21 روز مورد تیمارهای مختلف قرار گرفت. پس ازتهیه نمونه های خونی میزان هورمون های LH و FSH، تستوسترون و دی هیدروتستوسترون با استفاده از روش رادیو ایمونواسی (RIA) و تغییرات بافتی بیضه در مراحل اسپرماتوژنز بررسی گردید.

یافته‌ها: میزان هورمون های LH، FSH، تستوسترون و دی هیدروتستوسترون در گروه کنترل دیابتی کاهش معنی داری نسبت به گروه‌های کنترل و گروه شاهد داشت. هورمون‌های LH و تستوسترون در گروه تجربی 3 و 4 نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری نشان داد. افزایش هورمون‌هایFSH و دی هیدروتستوسترون تنها در گروه تجربی4 نسبت به گروه کنترل دیابتی معنی دار بود. بررسی بافت شناسی بیضه نشان دادکه تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لایدیگ در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد کاهش معنی‌داری دارد، در حالی که در گروه تجربی 4 که علاوه بر دیابتی شدن، 500 mg/kg عصاره دریافت کردند نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش معنی‌داری داشت.

نتیجه گیری: عصاره برگ زیتون اثرات جانبی دیابت را بر میزان گنادوتروپین‌ها، هورمون‌های جنسی و فرآیند اسپرماتوژنز کاهش می‌دهد و باعث بهبود عملکرد محور هورمونی هیپوفیز – بیضه به‌دنبال القای دیابت می‌شود.

واژه‌های کلیدی: برگ زیتون، دیابت، گنادوتروپین، هورمون جنسی، اسپرماتوژنز. رت

مقدمه

دیابت ملیتوس (DM) یکی از شایع‌ترین اختلالات آندوکرین است و تقریباً 6 درصد از جمعیت جهان را تحت تاثیر قرار می دهد(1). شواهد نشان می‌دهد هر دو نوع دیابت اثرات مضری بر عملکرد تولید مثلی مردان دارند (2) و علل شناخته شده‌ی اختلال در عملکرد جنسی و باروری مردان (هم در مردان و هم مدل های حیوانی) هستند(29). این بیماری با علائم متعددی از قبیل افزایش غلظت گلوکز پلاسما، احساس تشنگی، ادرار زیاد، کاهش وزن (34)، تاری دید و تغییر در متابولیسم لیپیدها، کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها مشخص می‌شود که در دراز مدت مشکلات متعددی برای بیمار ایجاد می‌کند (20). اختلالات آندوکرینی علت اصلی ناباروری در مردان مبتلا به دیابت است(27). مطالعات نشان می‌دهد ناباروری در مردان، امروزه یک تهدید است و به دلیل هیپرگلیسمی به سرعت افزایش می-یابد(3). هم‌چنین منجر به تولید اشکال اکسیژن

واکنش‌پذیر(Reactive Oxygen Species) و کاهش سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان‌ها و ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت‌های مختلف می‌شود(6). در حال حاضر درمان اصلی برای دیابت ملیتوس استفاده از داروهای هیپوگلیسمیک و انسولین می باشد، ولی این ترکیبات دارای عوارض نامطلوب متعدد نیز هستند(47). به دلیل عدم توانایی های موجود درمان های مدرن برای کنترل همه جنبه های پاتولوژیک این اختلال و هم‌چنین هزینه های عظیم آن، در حال حاضر استراتژی دیگری برای درمان دارویی دیابت مورد نیاز است(50، 14). شواهد نشان می دهد استفاده از گیاهان دارویی جهت افزایش باروری و نیز رفع مواردی از قبیل عدم تعادل هورمونی، ناتوانی جنسی، تعداد کم اسپرم، حرکت کند اسپرم و غیره می تواند تاثیر مثبت داشته باشند(10). برگ گیاه زیتون از قرن ها پیش در طب سنتی برای درمان دیابت استفاده شده است(23). عصاره برگ زیتون حاوی سکوایریدوئیدها مانند اولئوروپین و فلاونوئیدها از جمله آپی‌ژنین،کامپفرول و کورستین، لوتئولین، روتین، فیبر و هم‌چنین ترکیبات فنلی مانند اسید کافئیک، تیروزول، هیدروکسی تیروزول و اسید های چرب غیر اشباع می باشد(49، 40). اولئوروپین برجسته ترین ترکیب فنلی در آن است(41)و تصور می شود مسئول اثرات دارویی آن می باشد(17). عصاره برگ زیتون دارای خواص آنتی اکسیدان، ضد فشار خون، ضد التهاب، کاهش قند خون، ضدآریتمی، ضدمیکروبی، محرک‌تیروئید و ضدویروس است(22، 20). مصرف آنتی‌اکسیدان‌های پلی فنولیک موجود در زیتون و غیره عوارض دیابت را کاهش داده و سیستم آنتی اکسیدانی بدن را بهبود می-بخشد(15). مطالعات نشان می دهد اولئوروپین موجود درعصاره برگ زیتون افزایش قند خون و استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت را مهار می کند (35) و با نیرومند ساختن گلوکز ناشی از ترشح انسولین به عنوان مکانیسم عمل پیشنهادی و هم‌چنین به عنوان یک افزایش در جذب قند خون محیطی گزارش شده است(17). هم‌چنین از پیشرفت دیابت نوع 1 با منشاء خود ایمنی جلوگیری می‌نماید(11). با توجه به تاثیر دیابت بر تولید مثل و ناباروری در مردان، در این پژوهش نقش احتمالی عصاره هیدروالکلی برگ زیتون (*Olea europaea*) بر روی میزان هورمون‌های LH ، FSH، تستوسترون و دی هیدروتستوسترون و تغییرات بافت بیضه در موش صحرایی دیابتی نر در شرایط ابتلا به بیماری دیابت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

گروه بندی حیوانات مورد استفاده در آزمایش

در این مطالعه تجربی تعداد 48 سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی 220-200گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط 12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی و درجه حرارت 2±22 سانتی‌گراد در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی کازرون نگهداری شدند. آب و غذا در تمام طول دوره آزمایش بدون هیچ محدودیتی در اختیار آن‌ها قرار می گرفت زمان آزمایش مرداد ماه 1391 بود. در کلیه مراحل تحقیق اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌های مورد استفاده در این پژوهش ابتدا وزن، سپس به صورت تصادفی در 6 گروه 8 تایی به شرح زیر قرار داده شدند:

گروه کنترل، در طی دوره آزمایش ازآب و غذای استاندارد استفاده کرده و هیچ‌گونه عصاره یا دارویی دریافت نکردند. گروه شاهد، به مدت 21 روز و روزانه به مقدار 2 میلی‌لیترآب مقطر به صورت گاواژ دریافت کردند. گروه تجربی1، روزانه 2 میلی لیتر عصاره 500mg/kg برگ زیتون به مدت 21 روز به صورت گاواژ دریافت نمودند. گروه تجربی 2، این گروه با

تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان 60mg/kg دیابتی شدند. گروه تجربی 3، این گروه ابتدا با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین به مقدار 60mg/kg دیابتی شدند و روزانه به مدت 21 روز 2 میلی لیتر عصاره برگ زیتون به میزان 250 mg/kg به صورت گاواژ دریافت کردند. گروه تجربی 4، این گروه با تزریق داخل صفاقی استرپتوزوتوسین به مقدار60mg/kg دیابتی شدند و روزانه به مدت 21 روز 2 میلی لیتر عصاره برگ زیتون 500 mg/kg به صورت گاواژ دریافت کردند(26). بعد از گذشت یک هفته از تزریق داروی استرپتوزوتوسین از دم موش ها خون-گیری به عمل آمد و میزان قند خون با استفاده از دستگاه Easy gluco اندازه گیری و پس از اطمینان از دیابتی شدن حیوانات بعد از 7- 5 روز مصرف عصاره الکلی برگ زیتون آغاز شد.

تهیه عصاره هیدرو الکلی برگ زیتون

برای انجام این مطالعه تجربی از برگ گیاه زیتون(*Olea europaea* L.) استفاده شد. برگ های گیاه در حرارت 25 درجه سانتی‌گراد و در شرایط سایه خشک گردید و با استفاده از آسیاب برقی پودر و در ظرف شیشه ای درب داری ریخته و به نسبت 50/50 به آن آب و الکل اضافه گردید و به مدت 72 ساعت خیسانده تا تمامی موادی که در آب و الکل محلول هستند در آن حل شده، سپس آن را صاف نموده و در مرحله آخر در آون با دمای 40 درجه سانتی گراد گذاشته تاآب و الکل آن تبخیر گردد (16).

روش تجویز دارو، خون گیری و سنجش هورمونی

برای این کار از فیدر و سرنگ انسولینی استفاده گردید. در گروه های تجربی3 و 4 روزانه به ازای هر موش به ترتیب مقادیر2 میلی لیتر عصاره500 mg/kg و 250 به صورت گاواژ تجویز گردید. هم‌چنین در گروه تجربی 1 برای هر موش 2 میلی لیتر عصاره500 mg/kg به صورت گاواژ تجویز گردید. تجویز عصاره 21 روز و هر روز صبح در ساعت معینی ادامه پیدا کرد. بعد از پایان دوره آزمایش با اتر بیهوش و ازهر موش حدود 5 سی سی خون از ناحیه بطن چپ قلب در لوله های آزمایش جمع آوری شد. نمونه های جمع آوری شده به مدت 20 دقیقه با سرعت 5000 دور در دقیقه سانتریفیوژ و سرم آن تا زمان سنجش هورمونی در دمای 20- درجه سانتی‌گراد برای اندازه گیری غلظت سرمی LH، FSH، تستوسترون و دی‌هیدروتستوسترون نگهداری شد. اندازه گیری هورمونی بر اساس روش-های معمول آزمایشگاهی یعنی استفاده از روش رادیوایمونواسی انجام شد(13).

روش تهیه و مطالعه هیستو مورفولوژیکی نمونه های بافتی بیضه

جهت شمارش سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، سرتولی و لیدیگ، بافت بیضه خارج گردید و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی و توزین، در تثبیت کننده فرمالین قرار داده شد. پس از تهیه قالب های پارافینی، برش‌هایی به ضخامت 5 میکرون از بافت تهیه و پس از رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین–ائوزین، مقاطع بافتی برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شد. سپس سلول ها به کمک یک صفحه مدرج که بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ نوری قرار گرفت مورد شمارش قرار گرفت و مقایسه آماری صورت گرفت .

تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج از نرم افزار(ورژن 12) SPSS و آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه(ANOVA) به همراه آزمون تکمیلی توکی استفاده شد. اختلاف $P<0/05$ نیز معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

مقادیر هورمون های پلاسما در گروه‌های تجربی، کنترل و شاهد در جدول 1 ثبت شده است. همان طور که ملاحظه می شود بر اساس نتایج حاصل میانگین میزان هورمون LH در گروه تجربی 1 افزایش معنی داری در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد نشان می دهد (P<0/05). میانگین میزان این هورمون در گروه تجربی2 نسبت به گروه های کنترل و شاهد، کاهش معنی داری داشت(P<0/05)، هم‌چنین در گروه تجربی3 و گروه تجربی4، نیز افزایش معنی داری در میزان هورمون LH نسبت به گروه تجربی2مشاهده گردید(P<0/05). میانگین میزان هورمون FSH در گروه تجربی 2 کاهش معنی داری نسبت به گروه های کنترل و شاهد و در گروه تجربی 4 افزایش معنی داری نسبت به گروه تجربی 2 نشان داد (P<0/05). میانگین میزان هورمون تستوسترون در گروه تجربی 1 افزایش و در گروه تجربی 2 نسبت به گروه های کنترل و شاهد، نیزکاهش معنی داری نشان داد (P<0/05). هم‌چنین میزان هورمون تستوسترون در گروه تجربی 3 و 4، افزایش معنی داری نسبت به گروه تجربی2 نشان داد(P<0/05). میانگین میزان هورمون دی-هیدروتستوسترون در گروه تجربی 1 افزایش و در گروه تجربی 2 کاهش معنی داری نسبت به گروه‌های کنترل و شاهد نشان داد (P<0/05). گروه تجربی 4 افزایش معنی داری در میزان هورمون دی-هیدروتستوسترون نسبت به گروه تجربی 2 داشت (P<0/05) (جدول 1).

جدول1- اثر عصاره هیدروالکلی برگ زیتون بر میانگین غلظت هورمون های جنسی موش نر دیابتی

هورمون / گروه های آزمایش	LH (IU/L)	FSH(IU/L)	تستوسترون(nmol/L)	دی‌هیدروتستوسترون(ng/dl)
کنترل	0/38±0/007	0/66±0/015	5/2±0/11	47±0/87
شاهد	0/37±015	0/63±0/02	5/1±0/14	46/7±1/08
تجربی 1	0/43±0/011*	0/69±0/007	5/7±0/09*	52/1±0/68*
تجربی 2	0/27±0/011*	0/57±0/003*	4/2±0/09*	42/8±1/07*
تجربی 3	0/35±0/011**	0/61±0/033	4/6±0/05**	44/6±0/94
تجربی 4	0/36±014**	0/66±0/02**	4/8±0/05**	48/8±0/74**

علامت * نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه تجربی 2 با گروه های کنترل و شاهد است. علامت ** نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های تجربی 3 و 4 با گروه تجربی 2 است.

بررسی بافت‌شناسی بیضه نشان داد که میانگین تعداد سلول‌های سرتولی، لایدیگ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید در گروه تجربی 2 کاهش معنی داری نسبت به گروه های کنترل و شاهد نشان می‌دهد (P<0/05). در گروه تجربی4 افزایش معنی-داری در تعداد سلول های سرتولی، لایدیگ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید نسبت به گروه تجربی 2 مشاهده گردید (P<0/05)(جدول 2 و اشکال 1 الی10).

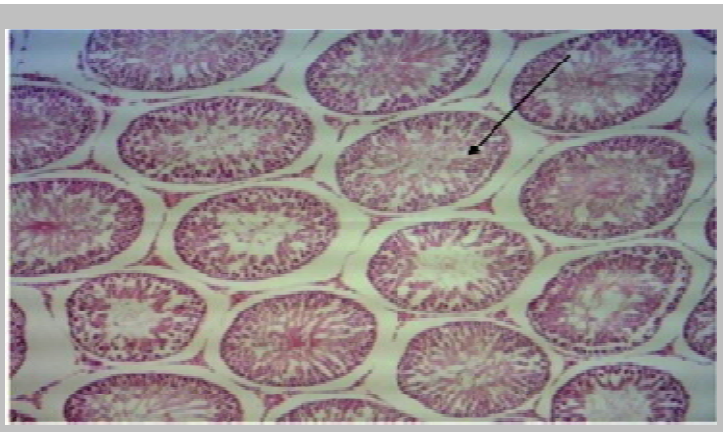
جدول 2- مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی برگ زیتون بر میانگین تعداد سلول‌های دودمان اسپرم، سرتولی و لایدیگ موش های نر دیابتی

تعداد سلول های جنسی / گروه های آزمایش	اسپرماتوگونی	اسپرماتوسیت	اسپرماتید	سرتولی	لایدیگ
کنترل	1/73±48/7	1/53±53/2	1/55±98/3	0/32±15/1	0/49±13/6
شاهد	1/93 ± 47/2	2/15 ± 52/1	2/2 ± 97/1	0/36 ± 14/7	0/32 ± 13/6
تجربی 1	2/67 ± 50/7	3/16 ± 55/6	3/02 ± 100/6	0/65 ± 16/1	0/49 ± 14/3
تجربی 2	*2/99 ± 32/2	*3/13 ± 30/3	*3/51 ± 51/2	*0/36± 11/2	*0/46± 10
تجربی 3	2/28 ± 41/1	2/03 ± 34	2/77 ± 58/6	0/58 ± 12/8	1/30 ± 12/8
تجربی 4	**4/44 ±46/1	**1/22 ±41	**1/44 ±62/8	**0/47 ±15/5	** 1/23 ±13/6

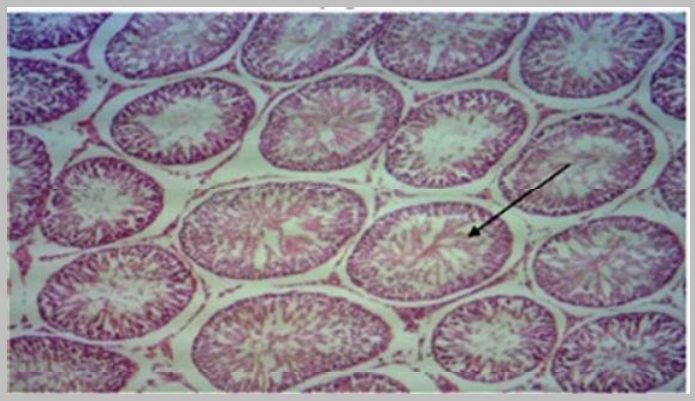
مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است . علامت * نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه تجربی 2 با گروه های کنترل و شاهد است.
علامت ** نشان دهنده اختلاف معنی دار بین گروه های تجربی 3 و 4 با گروه تجربی 2 است.* نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $P \leq 0/01$ نسبت به گروه کنترل

بحث و نتیجه گیری

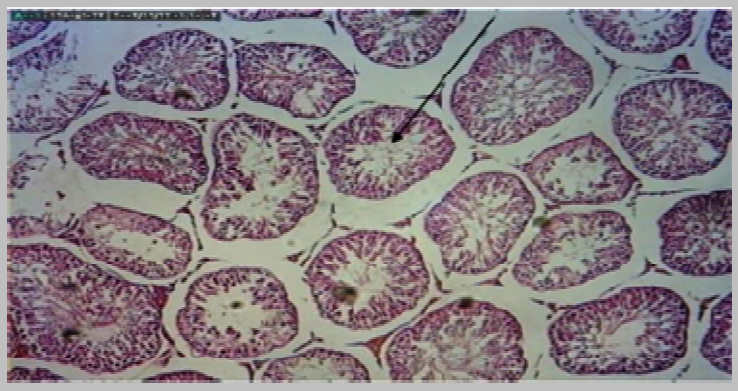
در این پژوهش تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ زیتون بر روی میزان گنادوتروپین ها و هورمون های جنسی و تغییرات بافت بیضه در موش صحرایی نر دیابتی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت. با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق عصاره برگ زیتون منجر به تغییر در میزان هورمون های جنسی و گنادوتروپ‌های گروه تیمار شده با عصاره برگ زیتون در موش های دیابتی گردید. نتایج نشان می دهد در گروه تجربی 2 میزان هورمون های LH و FSH، تستوسترون و دی-هیدروتستوسترون به طور معنی داری در مقایسه با گروه های کنترل و شاهد کاهش یافته است، هم‌چنین تیمار موش های صحرایی دیابتی با عصاره هیدرو الکلی برگ زیتون، میزان این هورمون ها را در گروه تجربی3 و گروه تجربی4، در مقایسه با گروه تجربی 2 افزایش داده است. بررسی بافت شناسی بیضه نیز نشان داد کاهش معنی داری درمیانگین های تعداد سلول های سرتولی، لایدیگ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید در گروه تجربی 2 نسبت به گروه های کنترل و شاهد وجود دارد($P<0/05$). در گروه تجربی4 افزایش معنی داری در تعداد سلول‌های سرتولی، لایدیگ، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید نسبت به گروه تجربی 2 مشاهده گردید ($P<0/05$)(جدول 2 و اشکال 1 الی10). شواهد نشان می دهد افزایش تولید رادیکال های آزاد و یا کاهش پاسخ های دفاعی آنتی اکسیدان ها، که هر دو درحالت دیابتی رخ می دهند منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می شود(25). پیامدهای استرس اکسیداتیو باعث آسیب به DNA، پروتئین ها، لیپیدها و اختلال در هموستازی سلولی و تجمع مولکول های آسیب دیده می‌گردد (18). کاهش استرس اکسیداتیو در شرایط دیابتی پس از ایجاد برخی از پلی فنول ها در حیوانات مشاهده می-گردد(43). مطالعات نشان می دهد دیابت منجر به کاهش هورمون آزاد کننده گنادوتروپین(GnRH) می شود(48، 45). کاهش GnRH نیز به نوبه خود باعث کاهش هورمون FSH، LH و استروئیدهای جنسی می-گردد(8). دیابت در سطوح هورمون های جنسی عدم تعادل ایجاد می‌کند، اغلب مطالعات انجام شده در موش صحرایی نر دیابتی ناشی از استرپتوزوتوسین، کاهش سطح تستوسترون را نشان می دهند(28).



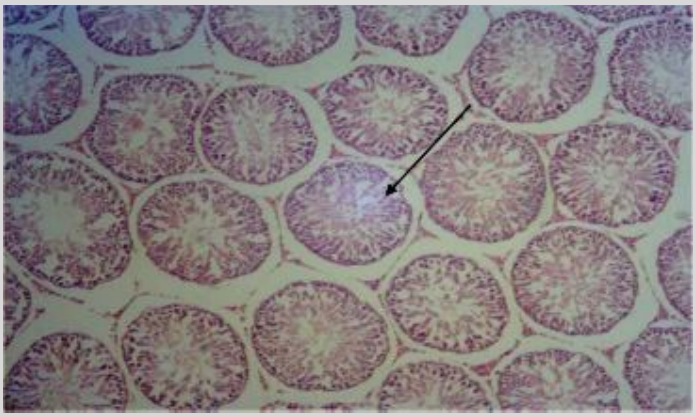
شکل 1- فتو میکروگراف لوله های اسپرم ساز در گروه کنترل، لوله های اسپرم ساز با تراکم زیاد، فاصله کم و منظم در بافت بیضه مشاهده می شود.



شکل 2- فتو میکروگراف لوله های اسپرم ساز در گروه شاهد، لوله های اسپرم ساز با تراکم زیاد، فاصله کم و منظم در بافت بیضه مشاهده می شود.

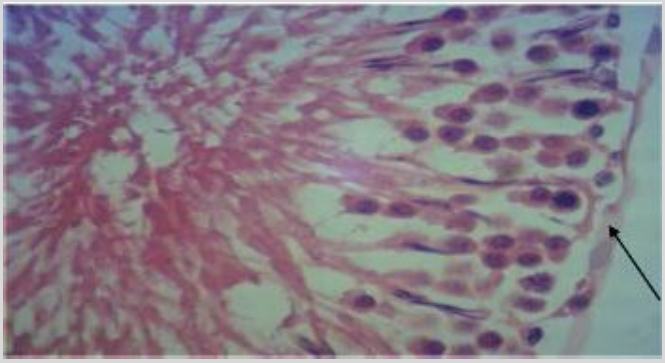


شکل 3- فتو میکروگراف لوله های اسپرم ساز در گروه تجربی2، لوله های اسپرم سازبا تراکم کمتر، فاصله بیشتر و نامنظم در بافت بیضه مشاهده می شود.

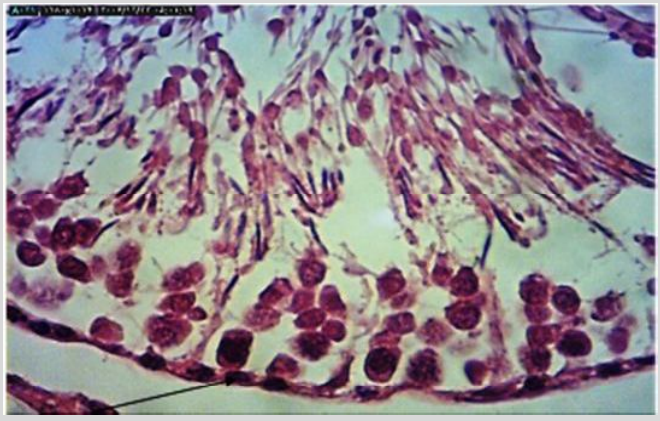


شکل4- فتو میکروگراف لوله های اسپرم ساز در گروه تجربی 4، لوله های اسپرم ساز با تراکم زیاد، فاصله کم و منظم تر در بافت بیضه مشاهده می شود.

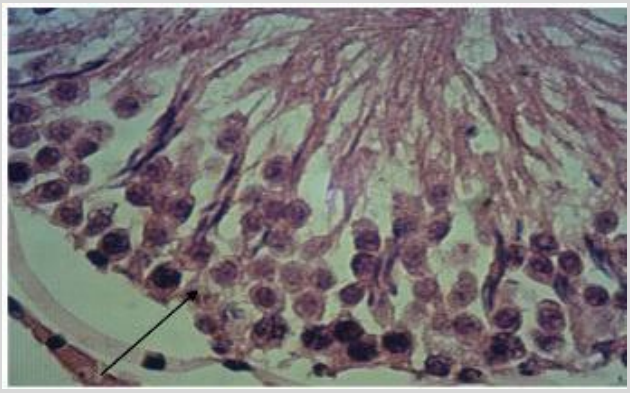
شکل 5- فتومیکروگراف سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سرتولی در مقطع عرضی لوله های اسپرم ساز در گروه کنترل. رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین 40X . فلش، نشان دهنده سلول های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید از نظر اندازه است که به سمت لومن قرار دارد.



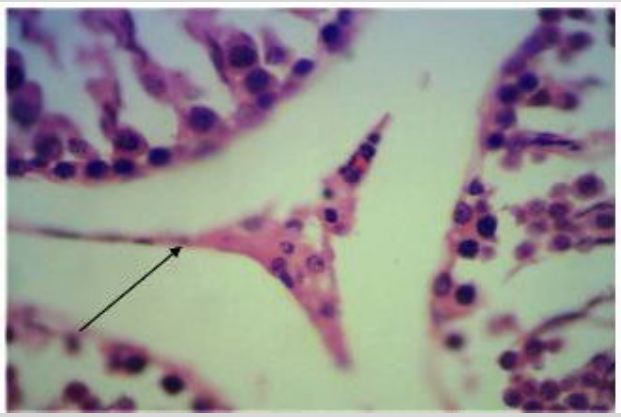
شکل 6- فتومیکروگراف سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سرتولی در مقطع عرضی لوله های اسپرم ساز در گروه شاهد. رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین. 40X . فلش ، نشان دهنده سلول های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید از نظر اندازه است که به سمت لومن قرار دارد.



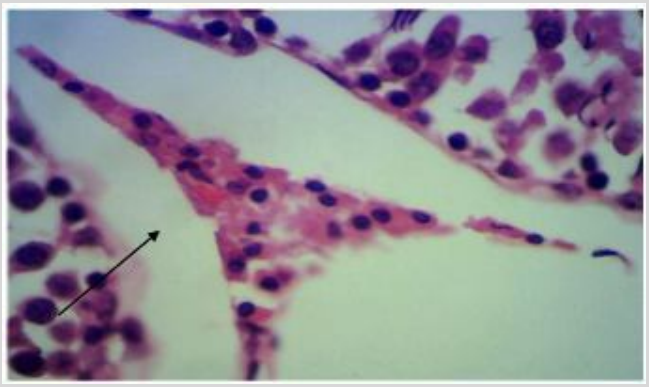
شکل7- فتومیکروگراف سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سرتولی در مقطع عرضی لوله های اسپرم ساز در گروه تجربی 2(دیابتی). رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین. 40X. فلش، نشان دهنده سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید از نظر اندازه است که به سمت لومن قرار دارد.



شکل8- فتومیکروگراف سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و سرتولی در مقطع عرضی لوله های اسپرم ساز در گروه تجربی 4(دیابتی + عصاره برگ زیتون). رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین. 40X. فلش، نشان دهنده سلول‌های اسپرماتوگونی، سرتولی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید از نظر اندازه است که به سمت لومن قرار دارد.



شکل 9- فتومیکروگراف سلول های لیدیگ در گروه تجربی 2 (دیابتی). رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائـوزین. 40X. فلـش، نشان دهنده تعداد سلول‌های لایدیگ است.



شکل10- فتومیکروگراف سلول های لیدیگ در گروه تجربی 4 (دیابتی + عصاره برگ زیتون). رنگ آمیزی با هماتوکسیلین- ائوزین. 40X. فلش، نشان دهنده تعداد سلول های لایدیگ است.

کاهش تولید آندروژن در ارتباط با کاهش سطح گنادوتروپین‌ها درخون است. در دیابت، مکانیسم کاهش تستوسترون ممکن است اثر مستقیم گلوکز یا متابولیت های آن، گنادوتروپین های معیوب، و یا مقاومت در برابر این هورمون باشد. مطالعات اخیر ارتباط مستقیم بین تستوسترون خون و گنادوتروپین ها را نشان داده است(30). میزان تبدیل پیش سازهای میزان تبدیل پیش سازهای استروئیدی به آندروژن ها در شرایط دیابتی کاهش می یابد و این مسئله منجر به کاهش میزان تبدیل پرگننولون و پروژسترون به تستوسترون و سایر استروئیدهای بیضه‌ای می‌گردد(18). شواهد نشان می دهد مصرف آنتی اکسیدان های پلی فنولیک موجود در عصاره برگ زیتون و غیره عوارض ناشی از دیابت را کاهش و سیستم آنتی اکسیدانی بدن را بهبود می بخشد(15). درصورت افزایش انسولین تولید SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) از کبد کاهش پیدا می‌کند و در نتیجه میزان تستوسترون آزاد افزایش می یابد(21). نیتریک اکسید از عوامل اثر گذار بر روی محور هیپوتالاموس– هیپوفیز– بیضه است. این مولکول باعث افزایش ترشح گنادوتروپ ها، بالا بردن تحرک اسپرم و القای نعوذ می‌شود(44). اولئوروپین موجود در عصاره برگ زیتون، فعالیت آنزیم نیتریک اکسید سنتاز را افزایش می دهد و باعث افزایش تولید نیتریک اکسید می گردد(51). نیتریک اکسید با افزایش آزاد سازی هورمون آزاد کننده گنادوتروپین، منجر به آزاد سازی گنادوتروپ ها از طریق فعال سازی آنزیم نیتریک اکسید سنتتاز نورونی در غده هیپوفیز می شود(39). سایرتحقیقات نشان می-دهد نوراپی نفرین سطح LH پلاسما را به دنبال تجویز اولئوروپین افزایش می‌دهد(40). اولئوروپین میزان هورمون کورتیزول را نیز افزایش می‌دهد (12) و موجب افزایش بیان ژن نوروپپتید Y در ناحیه قاعده‌ای-میانی هیپوتالاموس می گردد(42). نوروپپتید Y رهاسازی LH را تحریک می‌کند. از طرفی دیگر هورمون لپتین به واسطه سنتز نیتریک اکسید باعث افزایش ترشح FSH می شود(24). FSH به طور سینرژیک با LH درجهت تحریک سنتز آندروژن عمل می‌کند، بنابراین، کاهش گنادوتروپ ها می تواند نقش مهمی در کاهش تولید آندروژن در حیوانات دیابتی داشته باشد(36). هم‌چنین هورمون FSH سنتز و ترشح ABP را افزایش داده و از این طریق باعث تنظیم غلظت تستوسترون در لوله‌های منی ساز جهت فرآیند اسپرماتوژنز فراهم می شود(46). عصاره برگ زیتون به دلیل داشتن ترکیباتی مانند اولئوروپین که خواص آنتی‌اکسیدانی دارد باعث افزایش کاتکول آمین های مغزی می شود(32) و به دنبال آن ترشح GnRH

افزایش می یابد(38). این عمل باعث اتصال GnRH به گیرنده های خود در سطح سلول های گنادوتروپ و در نتیجه اتصال، سبب ترشح LH و FSH می‌گردد. سلول‌های لایدیگ در بیضه در پاسخ به تحریک هورمون LH، باعث افزایش تستوسترون می گردد(5). مطالعات نشان می دهد نور اپی‌نفرین و اپی‌نفرین نقش مهمی در تحریک ترشح تستوسترون بیضه ای دارند(33). افزایش سطح تستوسترون بیضه با توجه به تحریک هورمون LH مترشحه از غده هیپوفیز به علت افزایش سطح نوراپی نفرین پلاسما است. هم‌چنین اولئوروپین سطح کورتیکواسترون ها را کاهش می دهد و در نتیجه باعث افزایش هورمون تستوسترون می شود (31). از آن جایی که تستوسترون در پاسخ به LH مترشحه از غده هیپوفیز توسط سلول های لایدیگ بیضه تولید می شود احتمال دارد مکانیسمی که بر پایه آن میزان هورمون تستوسترون پس از استفاده از عصاره افزایش یافته است از طریق تاثیر مستقیم عصاره بر سلول های لوتئوتروپ هیپوفیز قدامی و افزایش LH باشد(7). مطالعات سایر محققان نشان می‌دهد که اولئوروپین موجود در عصاره برگ زیتون باعث افزایش سطح سرمی کلسترول لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL-C) می شود (19). با توجه به این‌که کلسترول پیش ساز هورمون های استروئیدی است پس با افزایش میزان کلسترول(HDL) سطح کلسترول افزایش می یابد (37). افزایش فعالیت کلسترول باعث افزایش سنتز پرگننولون و هورمون تستوسترون و سایر هورمون های استروئیدی می‌گردد(9). شواهد به دست آمده حاکی از تاثیر اسیدهای چرب اشباع و غیر اشباع موجود در عصاره برگ زیتون بر روی ترشح تستوسترون نیز می-باشد. این ترکیبات اسیدی فعالیت آنزیم آروماتاز را مهار می کند و با توجه به این‌که این آنزیم سبب تولید آندروژن به استروژن می گردد بنابر این مهار فعالیت این آنزیم باعث افزایش آندروژن(تستوسترون و دی-هیدروتستوسترون) در خون می شود(52). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ زیتون می تواند سطح هورمون های گنادوتروپ و جنسی را در موش های نر دیابتی تحت درمان با عصاره بهبود بخشد و اسپرماتوژنز را نیز تقویت کند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون انجام شده که بدین وسیله از ایشان تشکر و سپاسگزاری می گردد.

منابع

1.Adeghate, E., Schattner, P., Dunn, E. (2006). An update on the etiology and epidemiology of diabetes mellitus. Ann N Y Acad Sci, 1084; 1-29.

2.Amaral, S., Mota, PC., Lacerda, B., Alves, M., Pereira, Mde. L., Oliveira, PJ. (2009). Testicular mitochondrial alterations in untreated streptozotocin-induced diabetic rats. Mitochondrion, 9(1); 41-50.

3.Andy, P., Luiz, R., Marco, M., Luciana, A. (2009). Relation between diabetes mellitus and male fertility. Einstein, 7; 407–410.

4.Baccetti, B., La Marca, A., Piomboni, P. Capitani, S., Bruni, E., Petraglia, F. (2002). Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. Hum Reprod, 17(10); 2673-7.

5.Bélanger, A., Brochu, M., Cliché, J. (1986). Levels of plasma steroid glucuronides in intact and castrated men with prostatic cancer. J Clin Endocrinol Metab, 62; 812-5.

6.Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, 414; 813–820.

7.Carlson, BM. (2004). Human embryology and developmental biology. 3rd edition. Philadelphia: Elsevier; 21-22.

8.Codrington, AM., Hales, BF., Robaire, B. (2007). Chronic cyclophosphamide exposure alters the profile of rat sperm nuclear matrix proteins. Biol Reprod, 77(2); 303-11.

9.Conn, P. (1984). Gonadotropic relasing molecular and cellular biology ,physiology , and clinical. PPLICATION FED, 23; 2351-2368.

10. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S. (2005). Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res, 51 (2); 117 - 23.

11. Cvjetićanin, T., Miljković, D., Stojanović, I., Dekanski, D., Stosić-Grujicić, S. (2010). Dried leaf extract of *Olea europaea* ameliorates islet-directed autoimmunity in mice. Br J Nutr, 103; 1413-24.

12. El Mougy, S. A., Al-Qarawi, A. A., Bazaid, S. A. (2010). The Effect of an aqueous extract of olive (*Olea europaea*) leaves on the adrenal-kidney-pituitary axis in rats. Journal of Herbs. Spices & Medicinal Plants, 15(4); 352-360.

13. Eddouks, M., Lemhadri, A., Michel, JB. (2004). Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. J Ethnopharmacol, 94(1); 143-8.

14. Ganesan, K., Gani, SB., Arunachalam, GM., Moses, RP. (2007). Antihyper glycaemic and antiperoxidative effect of *Helicteres igora* L. bark extracts in streptozotocin induced diabetic rats. J. Appl. Biomed, 5;97–104.

15. Gautama, DK., Misro, MM., Chaki, SP., Sehgal, N. H. (2006). Physiological concentrations modulates leydig cell function inducing oxidative stress and apoptosis. Apoptosis, 11; 39–40.

16. Germanò, MP., D'Angelo, V., Sanogo, R., Morabito, A., Pergolizzi, S., De Pasquale, R. (2001). Hepatoprotective activity of *Trichilia roka* on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. J Pharm Pharmacol, 53(11); 1569-74.

17. Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, MJ. (1992). Hypo glycemic activity of olive leaf. Planta Med, 58; 513-515.

18. Jakus, V. (2000). The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. Bratisl. Lek. Listy, 101; 541–551.

19. Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S. (2008). Hypo lipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from *Chemlali olive* leaves. Chemico-Biological Interaction, 176; 88-98.

20. Karakaya, S.E.S. (2009). Studies of olive tree leaf extract indicate seveal potential health benefits. Nutr Rev, 67; 632–639.

21. Khaki, A., Fathiazad, F., Nouri, M., Khaki, AA., Jabbari Khameneh, H., Hammadeh, M. (2009). Evaluation of androgenic activity of *Allium cepa* on spermatogenesis in rat. Folia Morphologica, 68; 45-51.

22. Khayyal, MT. (2002). Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. Arzneimittelforschung, 52; 797-802.

23. Komaki, E., Yamaguchi, S., Maru, I. (2003). Identification of anti-alpha-amylase components from olive leaf extracts. Food Sci Technol Res, 9; 35-39.

24. Kosior-Korzecka, U., Bobowiec, R. (2006). Leptin effect on nitric oxide and GnRH-induced FSH secretion from ovine pituitary cells in vitro. J Physiol Pharmacol, 57(4); 637-647.

25. Kuhn-Velten, N., Waldenburger, D., Staib, W. (1982). Evaluation of steroid biosynthetic lesions in isolated Leydig Cells from the testes of streptozotocin-diabetic Rats. Diabetology, 23; 529-533

26. Kusunoki, J., Aragane, K., Kitamine, T., Kozono, H., Kano, K., Fujinami, K. (2000). Postprandial hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats is due to abnormal increase in intestinal acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20(1);171-8.

27. Maneesh, M., Jayalakshmi, H., Singh, TA., Chakrabarti, A. (2006). Impaired hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in men with diabetes mellitus. Indian J Clin Biochem, 21(1); 165-8.

28. Maric, C. (2009). Sex, diabetes and the kidney. Am J Physiol Renal Physiol, 296(4); F680–F688.

29. Musicki, B., Burnett, A.L. (2007). Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. Int. J. Impot. Res, 19; 129–138.

30. Navarro-Casado, L., Juncos-Tobarra, MA., Cháfer-Rudilla, M., de Onzoño, LÍ., Blázquez-Cabrera, JA., Miralles-García, JM. (2010). Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. J Androl, 31(6); 584-92.

31. Oi-Kano, Y., Kawada, T., Watanabe, T., Koyama, F., Watanabe, K., Senbongi, R. (2013). Oleuropein supplementation increases urinary noradrenaline and testicular testosterone levels and decreases plasma

corticosterone level in rats fed high-protein diet. J Nutr Biochem, 24(5); 887-93.
32. Oi-Kano, Y., Kawada, T., Watanabe, T., Koyama, F., Watanabe, K., Senbongi, R. (2008). Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 54(5); 363-70.
33. Oi, Y., Imafuku, M., Shishido, C., Kominato, Y., Nishimura, S., Iwai, K. (2001). Garlic supplementation increases testicular testosterone and decreases plasma corticosterone in rats fed a high protein diet. J Nutr, 131; 2150–6.
34.okon, U. A., Owo, D.U., Udokang, N.E., Udobang, J.A., Ekpenyong, C.E. (2012). Oral administration of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* ameliorates polyphagia, polydipsia and weight loss in streptozotocin-induced diabetic rats. American Journal of Medicine and Medical Sciences, 2(3); 45-49.
35. Omar, S. (2010). Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. Saudi Pharmaceutical J., 5; 1-11.
36. Orth, JM., Murray, FT., Bardin, CW. (1979). Ultrastructural changes in Leydig cells of streptozotocin-induced diabetic rats. Anat Rec, 195(3); 415-30.
37. Ostrowsaka, JG. (2006). Effect of dietary fat on androgen secretion and metabolism. Reprod Biol, 6; 13-21.
38. Parvizi, N., Ellendorff, F. (1982). Further evidence on dual effects of norepinephrine on LH secretion. Neuroendocrinology, 35(1); 48-55.
39. Pinilla, L., González, L.C., Tena-Sempere, M., Bellido, C., Aguilar, E. (2001). Effects of systemic blockade of nitric oxide synthases on pulsatile LH, prolactin, and GH secretion in adult male rats. Horm Res, 55; 229–235.
40. Poudyal, H., Campbell, F., Brown, L. (2002). Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate, high fat fed rats. J. Nutr. May, 140(5); 946-953.
41. Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europea* L. Scientia Horticulturae, 92; 147–176.
42. Sainsbury, A., Herzog, H. (2001). Inhibitory effects of central neuropeptide Y on the somatotropic and gonadotropic axes in male rats are independent of adrenal hormones. Peptides, 22(3); 46771.
43. Sanders, R. A., Rauscher, F. M., Watkins, J. B. (2001). III: effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Biochem. Mol. Toxicol, 15; 143–149
44. Sato, Y., Sukamoto, T. (2000). Effects of nitric oxide stimulation on the brain. Drugs Today (Barc), 36(2-3); 83-92.
45. Seethalakshmi, L., Menon, M., Diamond, D. (1987). The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. J. Urol. J Urol, 138(1); 190-4.
46. Simon, L. (2000). Dehydroepiandrosterone (DHEA). Neuroscience,15(4);56-69
47. Suji, G., Sivakami, S. (2003). Approaches to the treatment of diabetes mellitus : an overview. Cell Mol Biol, 49; 635-639.
48. Tanaka, T., Nagatani, S., Bucholtz, D.C., Ohkura, S., Tsukamura, H., Maeda, K. (2000). Central action of insulin regulates pulsatile luteinizing hormone secretion in the diabetic sheep model. Biol. Reprod.
49. Tavafi, M., Ahmadvand, H., Toolabi, P. (2012). Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Iran J Kidney Dis, 6(1); 25-32.
50. Ueda, H., Kaneda, N., Kawanishi, K., Alves, SM., Moriyasu, M. (2002). A new isoflavone glycoside from *Ceiba pentandra* L. Gaertner. Chem. Pharm. Bull, 50; 403–404.
51. Visioli, F., Bellosta, S., Galli, C. (1998). Oleuropein, the bitter principle of olives enhances nitric oxide production by mouse macrophages. Life Sciences, 62; 541–546.
52. Yang, NY., Li, K., Yang, YF., Li, YH. (2009). Aromatase inhibitory fatty acid derivatives from the pollen of *Brassica campestris* L. var. oleifera DC. J Asian Nat Prod Res, 11; 132-37.