

## مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی و فلاونوئید تام برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر میزان Bcl-2، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابت نوع یک

راهله رهباریان\*<sup>۱</sup>، غزال عطایی<sup>۲</sup>

۱. استادیار، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

### چکیده

زمینه و هدف: گیاه حرا دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و هیپوگلیسمیک می‌باشد. فلاونوئیدهای گیاه حرا از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند بنابراین تنش اکسیداتیو ناشی از بیماری‌های مختلف از جمله دیابت را مهار می‌نماید. هدف از این مطالعه مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی و فلاونوئید تام برگ گیاه حرا بر میزان Bax، Bcl-2، Caspase-9 و پروتئین p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابت نوع یک می‌باشد.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۴۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به ۶ گروه مساوی سالم، کنترل دیابتی، دو گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی اندام هوایی حرا (۵۰ و ۱۰۰ mg/Kg) و دو گروه دیابتی تحت تیمار با فلاونوئید تام اندام هوایی حرا (۵۰ و ۱۰۰ mg/Kg) به طور تصادفی ساده تقسیم شدند. در پایان دوره درمان میزان Bax، Bcl-2، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان توسط روش الیزا سنجش شد.

نتایج: با توجه به نتایج به دست آمده، میزان Bax، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ mg/Kg فلاونوئید حرا در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به صورت وابسته به دوز تزریقی به طور معنی‌داری کاهش و میزان Bcl-2 به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). میزان Bax، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان گروه تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ mg/Kg عصاره هیدروالکلی در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به طور معنی‌داری کاهش و میزان Bcl-2 به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). در مقایسه بین فلاونوئید کل و عصاره هیدروالکلی در غلظت ۵۰ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی در غلظت ۱۰۰، فلاونوئید تام نسبت به عصاره هیدروالکلی تغییرات معنی‌داری را در پارامترهای مورد بررسی ایجاد نمود ( $p > 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: فلاونوئید تام برگ در مقایسه با عصاره هیدروالکلی حرا در کاهش آپوپتوزیس و پروتئین p53 در بافت تخمدان موش‌های دیابتی نوع یک می‌تواند موثرتر باشد.

### کلید واژه‌ها:

گیاه حرا، آپوپتوزیس، دیابت، بافت تخمدان، P53، موش صحرایی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه محفوظ است.

## مقدمه

واسطه‌ی آپوپتوز در سلول‌های پودوسیت دیواره داخلی کپسول بومن مبتلایان به دیابت نوع یک شناسایی کرده است (۸). 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 مهارى در فرایند آپوپتوزیس داشته باشد (۹). آپوپتوزیس همانند تکثیر و تمایز، بخشی از فیزیولوژی سلول است و در رشد طبیعی سلول‌ها و بافت‌ها و نیز جلوگیری از بیماری‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند. هنگامی که سلول تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی یا حتی درونی، مانند برخی بیماری‌های متابولیک، پرتو‌های یونیزان، داروهای سایتوتوکسیک و غیره قرار می‌گیرد، نسبت بین عوامل القاء کننده مانند Bax و مهار کننده مانند Bcl-2 که نقش مهمی در بقاء سلول و یا در شروع فرایند آپوپتوزیس دارد تغییر می‌کند و به دنبال آن کاسپازها فعال می‌شوند (۱۰). مطالعات نشان داده است شرایط استرس اکسیداتیو می‌تواند محرکی برای شروع فرایند آپوپتوزیس باشد. همچنین مشخص شده است افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن با القاء استرس اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو DNA می‌توانند موجب شروع فرایند آپوپتوزیس شود (۱۱).

گیاه حرا با نام علمی *Vierh Avicennia marina* (Forsk.) از خانواده Avicenniaceae یکی از اعضاء گیاهان مانگرو می‌باشد. گیاه حرا غنی از انواع فیتوالکسین‌ها، استروئیدها، اسیدهای کربوکسیلیک، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و تری‌ترین‌ها می‌باشد (۱۲). 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 (۱۳). مطالعات نشان داده است تجویز برگ گیاه حرا به موش‌های صحرایی موجب کاهش سطح سرمی گلوکز می‌شود (۱۴). در پژوهشی دیگر مشخص شده است

دیابت قندی از نظر بالینی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غدد درون‌ریز است. کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری با عوارض متابولیکی حاد و مزمن همراه می‌باشد (۱). بر اساس پیش‌بینی‌های به عمل آمده، در آینده شیوع بیماری دیابت در جامعه انسانی افزایش خواهد یافت. در حال حاضر درمان اصلی و مؤثر برای دیابت قندی استفاده از انسولین و داروهای کاهنده گلوکز خون می‌باشد؛ ولی این ترکیبات دارای عوارض نامطلوب می‌باشند (۲).

علاوه بر عوارض شایع دیابت، مشخص شده است دیابت با ایجاد اختلالات متابولیک، غدد درون‌ریز را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در عملکرد طبیعی محورهای هورمونی اختلال ایجاد می‌کند (۳). همچنین از دیابت به‌عنوان یکی از علل ناباروری نام برده می‌شود زیرا تحقیقات نشان داده است دیابت موجب اختلال در عملکرد تخمدان از جمله اختلال در رشد فولیکولی، اختلال در بلوغ اووسیت و کاهش تخمک‌گذاری می‌شود (۴). استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در بیماری دیابت و اختلالات ناشی از آن ایفاء می‌کند و مشخص شده است سطوح بالای گلوکز می‌تواند به تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش استرس اکسیداتیو و در نتیجه سبب آسیب تخمدان و فولیکول‌های تخمدانی شود (۵). تحقیقات نشان داده است استرس اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی سبب انباشت پروتئین P53 در سیتوزول سلول‌های بتای پانکراس می‌شود. P53 سبب اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش اکسیداسیون گلوکز می‌شود. این امر سیگنالینگ ترشح انسولین را کاهش می‌دهد. بنابراین کنترل P53 سیتوزولی احتمالاً یک استراتژی درمانی مهم برای پیشگیری و کاهش عوارض سلولی در مبتلایان به دیابت نوع یک می‌باشد (۶). از سوی دیگر نتایج تحقیقات حاکی از این مطلب است که هیپرگلیسمی از طریق افزایش بیان پروتئین P53 سبب القاء آپوپتوز در میوسیت می‌شود (۷). همچنین تحقیقات پروتئین سرکوب کننده تومور P53 را به‌عنوان یک

به صورت داخل صفاقی با ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی و یا با ۰/۵ میلی‌لیتر فلاونوئید تام برگ گیاه حرا تیمار شدند. غلظت عصاره و فلاونوئید بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شد (۵).

برگ درخت گیاه حرا از سواحل شمالی جزیره قشم جمع‌آوری و توسط کارشناس مربوطه مورد تایید قرار گرفت. گیاه حرا پس از طی مراحل خشک شدن در سایه در دمای  $36 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب خرد شد. جهت تهیه عصاره ۱۰۰ گرم از پودر خشک شده برگ گیاه حرا داخل پرکولاتور ریخته شد و به آن الکل اتیلیک ۸۰ درصد اضافه گردید. به طوری که کاملاً در الکل غوطه‌ور شود. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شد و پس از آن به کمک کاغذ صافی فیلتر شد. عصاره به دست آمده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا خشک شود. پس از حذف حلال، عصاره با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تهیه و به موش‌های صحرایی دیابتی تزریق شد.

برای اجرای این تحقیق، در ابتدا موش‌هایی انتخاب شدند که دارای ۲ الی ۳ دوره استروس منظم در طی ۱۲ الی ۱۴ روز مشاهده اسمیر واژینال، بودند. جهت تعیین منظم بودن سیکل استروس از اسمیر واژینال استفاده شد. ابتدا ۰/۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی توسط سمپلر مدل (Transferpette®S, Brand, Germany) به آرامی در واژن حیوان تزریق شد. سپس یک تا دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر تهیه شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مدل (Olympus, Japan) CX21FS1 با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر بررسی شدند. موش‌هایی که در مرحله استروس سیکل تولید مثلی قرار داشتند جهت مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. اسمیر واژن در مرحله استروس دارای سلول‌های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول‌های اپی‌تلیال بوده و فاقد لوکوسیت است. در این روش از بین ۱۱۵ سر موش صحرایی ماده، ۴۲ سر انتخاب شد.

مدل تجربی دیابت (دیابت نوع ۱) در موش صحرایی با یکبار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات (Sigma-Aldrich, Germany) به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایجاد شد.

فلاونوئیدهای گیاه حرا از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند (۱۵). تحقیقات بیانگر اثر 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 (۱۶ و ۱۷). با توجه به روند رو به رشد استفاده از گیاهان دارویی و وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در گیاه حرا هدف از این مطالعه مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی و فلاونوئید تام برگ گیاه حرا بر میزان Bax, Bcl-2, Caspase-9 و پروتئین p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابت نوع یک می‌باشد.

### روش‌ها

در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از موش‌های صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار استفاده شد. تعداد ۴۲ سر موش صحرایی با محدوده سنی  $105 \pm 5$  روز و محدوده وزنی  $168 \pm 4$  گرم در دمای محیطی  $24 \pm 4$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی  $35 \pm 5$  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. به منظور حصول سازش با محیط، آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز بعد از استقرار حیوانات به انجام رسید. موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به ۶ گروه (در هر گروه ۷ سر موش صحرایی) شامل گروه کنترل (که موش‌های سالم در آن قرار داشتند)، گروه کنترل دیابتی، دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا (HPLC,  $\geq 85.0\%$ ) و دو گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا تقسیم شدند.

گروه‌های کنترل و کنترل دیابتی به مدت ۳۰ روز و به صورت داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین به عنوان حلال دارو دریافت کردند. گروه‌های دیابتی تحت تیمار، به مدت ۳۰ روز و

## نتایج

تحلیل داده‌های این مطالعه نشان داد میزان Bcl-2 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). میزان Bax، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0/05$ ).

میزان Bcl-2 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0/05$ ). میزان Bax، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ).

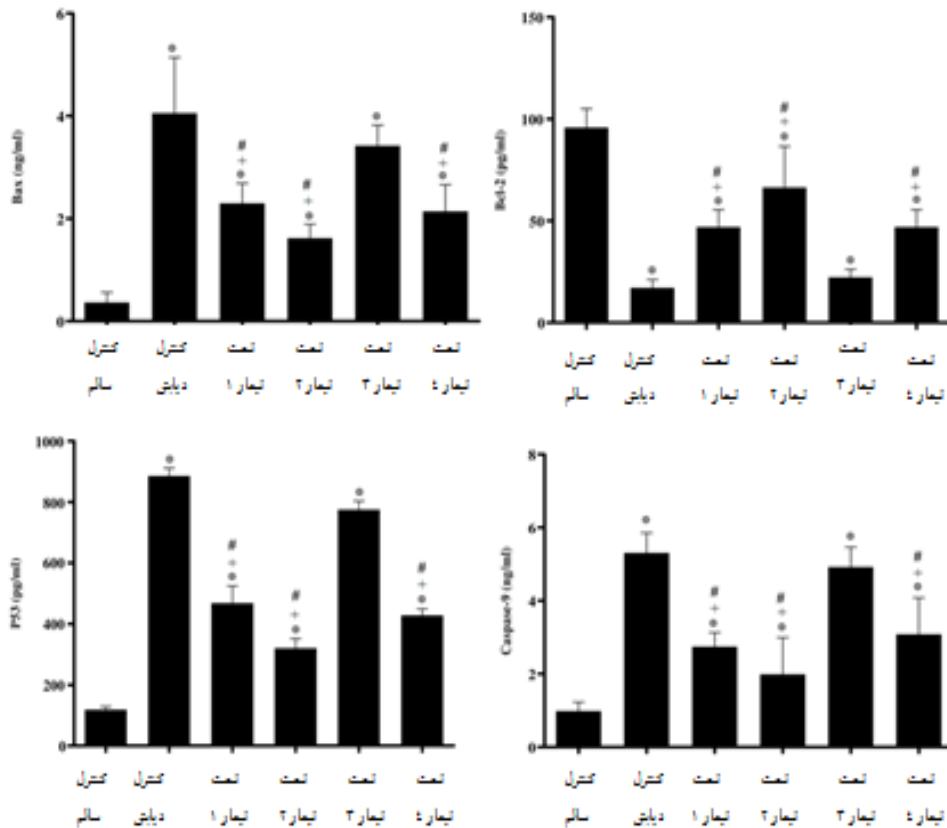
میزان Bcl-2 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0/05$ ). میزان Bax، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه کنترل دیابتی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p < 0/05$ ). این مقایسه برای غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا اختلاف معنی‌داری نداشت ( $p > 0/05$ ). (نمودار-۱).

همچنین از بافر سیترات (pH=۵/۴) به‌عنوان حلال آلوکسان استفاده گردید. آلوکسان به گروه کنترل دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار تزریق شد. مطالعه بر روی دیابت مزمن می‌باشد، به همین دلیل حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان و اقیاء 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 بر دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد (۲۱).

پارامترهای پژوهش حاضر توسط روش ELISA، دستگاه الایزایدر (Stat Fax-2100, USA) و کیت‌های ساخت شرکت فاین تست (China) سنجش شد. کیت Bcl-2 دارای حساسیت  $9/375 < 9/375$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/۶۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، کیت Bax دارای حساسیت  $0/188 < 0/188$  نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰-۰/۳۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر، کیت Caspase-9 دارای حساسیت  $0/094 < 0/094$  نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰-۰/۱۵۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر و کیت P53 دارای حساسیت  $46/875 < 46/875$  پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۵۰۰۰-۷۸/۱۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

کلیه عملیات آزمایشگاهی با رعایت اصول اخلاق کار با حیوانات با مجوز اخلاق صادر شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه صورت گرفت.

با توجه به این‌که نتایج به دست آمده کمی است، توسط آزمون کولموگوروف اسمیرنوف فرض نرمال بودن توزیع فراوانی داده‌ها برقرار شد ( $p > 0/05$ ). داده‌ها توسط آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شد. همچنین نتایج به‌دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به صورت خطای معیار میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۲ تحلیل شد.



نمودار ۱) میانگین میزان Bax، Bcl-2، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه. گروه دیابتی تحت تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا (گروه تحت تیمار ۱)، گروه دیابتی تحت تیمار با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا (گروه تحت تیمار ۲)، گروه دیابتی تحت تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا (گروه تحت تیمار ۳)، گروه دیابتی تحت تیمار با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا (گروه تحت تیمار ۴).

##  $p < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل

+  $p < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل دیابتی

#  $p < 0.05$  در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید

## بحث

Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی شده است. افزودن فلاونوئید تام برگ گیاه و همچنین عصاره هیدروالکلی گیاه با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب افزایش میزان Bcl-2 و کاهش میزان Caspase-9، Bax و p53 در بافت تخمدان موش‌های دیابتی شده در مقایسه با موش‌های دیابتی شده بدون تیمار شده است که این امر موجب کاهش اثرات تخریبی ناشی از دیابت شده است. در مقایسه اثر بخشی عصاره هیدروالکلی گیاه و فلاونوئید تام برگ گیاه با توجه

این پژوهش به مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی و فلاونوئید تام برگ گیاه حرا بر میزان Bax، Bcl-2، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابت نوع یک پرداخت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان Bcl-2 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و میزان Caspase-9، Bax و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که دیابت سبب کاهش میزان Bcl-2 و افزایش میزان Bax

in vitro به طور معنی داری افزایش می یابد. همچنین گزارش شده است هیپرگلیسمی مزمن از یک سو می تواند سبب افزایش میزان پروتئین P53 شود و از سوی دیگر می توان با مهار بیان RNA پروتئین P53 محافظت قابل توجهی در برابر آپوپتوز ایجاد کرد (۲۴). در پژوهشی دیگر محققین نشان داده اند افزایش پروتئین P53 ناشی از دیابت می تواند روند پیری را در سلول های بنیادی اندوتلیال شتاب دهد. همچنین محققین فعال سازی مسیر سیگنالینگ P53 را به عنوان یک رویداد حیاتی که می تواند سبب اختلالات و عوارض گسترده در مبتلایان به دیابت شود، شناسایی کرده اند (۲۵).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در مقایسه با عصاره هیدروالکلی آن در کاهش آپوپتوزیس و پروتئین P53 در بافت تخمدان موش های صحرایی دیابتی نوع یک موثرتر است. نتایج تحقیقات پیشین بیانگر اثر محافظتی عصاره برگ گیاه حرا بر بافت تخمدان موش های صحرایی دیابتی می باشد و گزارش شده است استفاده از گیاه حرا می تواند در بهبود اختلالات هورمونی و آسیب بافت تخمدان در بیماران دیابتی موثر باشد (۱۶). نتایج پژوهشی نشان داد که عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه حرا سبب کاهش سطح سرمی قند خون در موش های صحرایی دیابتی می شود و نیز عصاره برگ گیاه حرا سبب افزایش مصرف گلوکز و یا کاهش آزادسازی قندها از منابع ذخیره ای می شود (۱۴). بنابراین می توان احتمال داد نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر ناشی از اثر هیپوگلیسمی ترکیبات موجود در گیاه حرا می باشد. با توجه به این که فلاونوئیدها یکی از بیشترین پلی فنول های گیاه حرا است (۲۶)، این ترکیبات می توانند سبب مهار آپوپتوز، افزایش ترشح انسولین از طریق هیپرتروفی سلول های بتا پانکراس، بهبود هیپرگلیسمی از طریق تنظیم متابولیسم گلوکز در سلول های هیپاتوسیتی، کاهش مقاومت به انسولین و کاهش التهاب و استرس اکسیداتیو می شوند (۲۷). تحقیقات پیشین گویای اثر فلاونوئیدها بر کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در موش های دیابتی مبتلا به نفروپاتی است (۲۸). محققین نشان

به نمودار تغییرات ایجاد شده در شاخص های مورد بررسی می توان گفت که عصاره فلاونوئید تام در کاهش اثرات تخریبی دیابت موثرتر از عصاره هیدروالکلی گیاه عمل نموده است. محققین گزارش کرده اند که افزایش استرس اکسیداتیو متعاقب بیماری دیابت سبب افزایش میزان ROS و کاهش ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی می شود، در نتیجه آپوپتوز روی می دهد و سبب مرگ سلول های تخمدانی می شود (۱۸). همچنین گزارش شده است افزایش مزمن قند خون در بیمار دیابتی سبب کاهش میزان گلوکاتیون در میتوکندری، افزایش تولید رادیکال های آزاد اکسیژن، فعال شدن کاسپازها و در نهایت القاء آپوپتوز می گردد (۱۹). از سوی دیگر علت وقوع آپوپتوز در سلول های تخمدان بیماران دیابتی نوع یک، علاوه بر افزایش استرس اکسیداتیو، وقوع فرآیند التهابی و حضور سیتوکاین های التهابی است. علاوه بر این التهاب سیستمیک سبب تولید نیتریک اکساید شده و در نهایت مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول های تخمدانی به وقوع می پیوندد (۲۰). محققین نشان دادند دیابت به طور مشخص بر بلوغ تخمک و تخمک گذاری تاثیر دارد و با القاء آپوپتوز در سلول های گرانولوزا سبب کوچکتر شدن فولیکول های تخمدانی می شود. همچنین تعداد فولیکول های آپوپتوزی افزایش می یابد (۲۱). همسو با نتایج پژوهش حاضر محققین نشان داده اند افزایش مزمن قند خون در موش های صحرایی مبتلا به دیابت نوع یک با افزایش نسبت Bax/Bcl-xL و Bax/Bcl-2 در نورون های هیپوکامپ همراه است. به این ترتیب با افزایش بیان پروتئین های پرو آپوپتوزی و کاهش بیان پروتئین های ضد آپوپتوزی مرگ سلولی در این سلول ها القاء می شود. همچنین گزارش شده است سطح بالای قند خون از طریق تولید و تجمع رادیکال های آزاد سبب القاء آپوپتوز می شود (۲۲). محققین گزارش کرده اند فعال شدن مسیر آپوپتوزیس در بافت بیضه موش های صحرایی مبتلا به دیابت نوع یک با افزایش سیتوزولی پروتئین P53 ارتباط مستقیم دارد (۲۳). طی پژوهشی مشخص شده است سطح پروتئین P53 در فیبروبلاست پوستی مبتلایان به دیابت هم در شرایط in vivo و

مصرفی سبب کاهش آپوپتوزیس و کاهش پروتئین P53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی شود. فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در مقایسه با عصاره هیدروالکلی آن در کاهش آپوپتوزیس و پروتئین P53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک موثرتر است. از این رو می‌توان به نقش فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در کاهش آپوپتوز سلول‌های تخمدانی و احتمالاً عدم تخمک‌گذاری ناشی از دیابت اشاره کرد.

#### تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از کلیه افرادی که در مراحل نگارش این مقاله همکاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

#### تضاد منافع

در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

#### مشارکت نویسندگان:

- (۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده‌ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها: همه نویسندگان
- (۲) تهیه پیش نویس مقاله یا بازبینی آن جهت تدوین محتوای اندیشمندانه: همه نویسندگان
- (۳) تایید نهایی دستنوشته پیش از ارسال به مجله: همه نویسندگان

داده‌اند تجویز عصاره حرا می‌تواند در برابر تخریب نورونی ناشی از دیابت اثر محافظی داشته باشد و گزارش شده است یکی از مکانیسم‌های اصلی ترکیبات گیاه حرا جهت حفاظت نورونی، ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن است. همچنین فلاونوئیدها از طریق کاهش سطح رادیکال‌های آزاد سلولی اثر محافظتی بر سلول‌های عصبی دارند و از تخریب نورونی ناشی از القاء آپوپتوزیس جلوگیری می‌کنند (۲۹). در واقع فلاونوئیدهای گیاه حرا اثرات محافظتی خود را در برابر رادیکال‌های آزاد توسط خصوصیات آنتی‌اکسیدانی خود القا می‌کنند (۳۰). تحقیقات نشان داده‌اند فلاونوئیدها سبب کاهش التهاب در ناحیه آسیب دیده می‌شوند. به طوری که این ترکیبات از ترشح سایتوکین‌ها و ترکیبات التهابی ناشی از دیابت جلوگیری می‌نماید و با کاهش التهاب در محل آسیب از مرگ سلولی ناشی از آپوپتوزیس جلوگیری می‌کند (۲۹). از سوی دیگر مشخص شده است ترکیبات فلاونوئیدی گیاه حرا دارای خواص ضد التهابی هستند (۲۹). احتمالاً گیاه حرا با کاهش التهاب در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی سبب کاهش آپوپتوزیس شده است.

#### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت تیمار موش‌های صحرایی دیابتی با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا می‌تواند به صورت وابسته به دوز

## References

1. Lemelman MB, Letourneau L, Greeley SAW. Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management. Clin Perinatol. 2018; 45(1): 41-59.
2. Jahantash M, Abednatanzi H, Gholami M, Ghazalian F. Gene Expression Changes in Bax and Bcl2 and Their Ratio in Liver Tissue with High Intensity Training. Iranian journal of diabetes and metabolism 2023; 22(6):384-398.
3. Pasquali R. Sex hormones and the development of type 2 diabetes in women. JLPM. 2017; 2(5):1-5.
4. 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.
5. Sadoughi D., Edalatmanesh M.A, Rahbarian R. Investigating the Effect of *Avicennia Marina* Aqueous Extract on Neuronal Density of Hippocampus CA1, CA2, CA3 and Dentate Gyrus in Diabetic Rats. Neuroscience journal of shefay khatam. 2017; 5(2): 28-34.
6. Hoshino A, Ariyoshi M, Okawa Y, Kaimoto S, Uchihashi M, Fukai K, et al. Inhibition of p53 preserves Parkin-mediated mitophagy and pancreatic  $\beta$ -cell function in diabetes. Proc Natl Acad Sci USA. 2014; 111(8): 3116-21.
7. Che-Pei Kung and Maureen E. Murphy. The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes. J endocrinol. 2017; 231(2): 61-75.
8. Eid AA, Ford BM, Block K, Kasinath BS, Gorin Y, Ghosh-Choudhury G, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes. J Biol Chem. 2010; 285(48): 37503-12.
9. Laulier C, Lopez BS. The secret life of Bcl-2: apoptosis-independent inhibition of DNA repairs by Bcl-2 family members. Mutat Res. 2012; 751(2): 247-57.
10. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495-516.
11. İzmir Atatürk Training and Reserach Hospital. Diabetes, Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction. Bezmialem Science. 2019; 7(1): 52-57.
12. Saenger P, West PW. Phenotypic variation of the mangrove species *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. From seven provenances around Australia. Aquatic Botany. 2018; 149: 28-32.
13. Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. AJPS. 2018; 13(1): 12-23.
14. 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.
15. Thatoi HN, Patra JK, Das SK. Free radical scavenging and antioxidant potential of mangrove plants: a review. Acta Physiologiae Plantarum. 2014; 36(3): 561-579.
16. Rahbarian R, Sadoughi SD, Esmaili 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.
17. Zamani Gandomani M, Forouzandeh Malati E. Antinociceptive effect of extract of mangrove (*Avicennia marina*) in male rats. MJTUOMS. 2014; 36(1):34-9.
18. Wang Q, Frolova AI, Purcell S, Adastra K, Schoeller E, Chi MM, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in cumulus cells of



type I diabetic mice. PLoS One. 2010; 5(12): e15901.

19. Lin S, Lin K, Li W, Zhou X, Huang T. Maternal diabetes increases apoptosis in mice oocytes, not 2-cell embryos. Endocrine. 2010; 37(3): 460-6.

20. Wang Q, Moley KH. Maternal diabetes and oocyte quality. Mitochondrion. 2010; 10(5): 403-10.

21. Guangjian, Jg, juangli Z, An T, et al, effects of type 1 diabetes on the proteome of mouse oocytes. 2016; 39(6):2320-2330

22. Ataei GH, Rahbarian R, Rajabian M. Effects of crocin on Bax, Bcl2 and oxidative stress indexes in testicular tissue of streptozotosin diabetic rats. Quarterly of the horizon of medical science. Exp Diabetes Res. 2019; 5(4):340-352

23. Zhao Y, Tan Y, Dai J, Li B, Guo L, Cui J, et al. Exacerbation of diabetes-induced testicular apoptosis by zinc deficiency is most likely associated with oxidative stress, p38 MAPK activation, and p53 activation in mice. Toxicol Lett. 2011; 2011(1-2): 100-106.

24. Uhlemeyer C, Müller N, Rieck M, Kuboth J, et al. Selective ablation of P53 in pancreatic beta cells fails to ameliorate glucose metabolism in genetic dietary and pharmacological models of diabetes mellitus. Molecular metabolism. 2023; 67:56-66.

25. Ingaramo MC, Gas Sa´ nchez J A, Perrimon N, Dekanty A. Fat Body p53 Regulates Systemic Insulin Signaling and Autophagy under Nutrient Stress via Drosophila Upd2 Repression. Cell reports. 2020; 33(1): 1-20.

26. Kamaei L, Moghadamnia D. Comparison of Antidiabetic Effects of Aqueous Extract of the Leaves and Fruits of *Avicennia Marina* in

Streptozotocin-induced Diabetic Male Rats. Iranian Journal of Toxicology 2019; 13(2): 7-12.

27. Babu PV, Liu D, Gilbert ER. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. J Nutr Biochem. 2013; 24(11): 1777-89.

28. Gomes IB, Porto ML, Santos MC, Campagnaro BP, Pereira TM, Meyrelles SS, et al. Renoprotective, anti-oxidative and anti-apoptotic effects of oral low-dose quercetin in the C57BL/6J model of diabetic nephropathy. Lipids Health Dis. 2014; 13: 184.

29. Sadoughi SD, Edalatmanesh MA, Rahbarian R. Investigating the Effect of *Avicennia Marina* Aqueous Extract on Neuronal Density of Hippocampal CA1, CA2, CA3 and Dentate Gyrus in Diabetic Rats. Shefaye Khatam. 2017; 5(2): 28-35.

30. Matias I, Buosi AS, Gomes FCA. Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. Neurochem Int. 2016; 95: 85-91.

## Comparison of the effect of hydroalcoholic extract and flavonoid of *Avicennia marina* leaves on Bax, Bcl<sub>2</sub>, Caspase-9 and p53 in ovarian tissue of type 1 diabetic rats

Raheleh Rahbarian <sup>1\*</sup>, Ghazal Ataei<sup>2</sup>

1. Assistant professor, Department of Biology, College of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Masters of biochemistry, Department of Biology, College of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

**Corresponding author:** Department of Biology, College of Sciences,  
Payame Noor University, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Aim:** *Avicennia marina* plant has antioxidant and hypoglycemic properties. The flavonoids of the *Avicennia marina* plant prevent the formation of oxygen free radicals; therefore, it can inhibit the oxidative stress caused by various diseases, including diabetes. This study aimed to investigate the effects of hydroalcoholic extract and flavonoid of mangrove (*Avicennia marina*) leaves on Bax, Bcl<sub>2</sub>, Caspase-9 and p53 in ovarian tissue of type 1 diabetic rats.

**Methods:** In this experimental study, 42 rats were randomly divided into 6 groups: control, non-treated diabetic and 2 leaf total flavonoid -treated diabetic groups (50, 100 mg/ml, and 2 hydroalcoholic extract treated diabetic groups (50, 100 mg/ml). At the end of the treatment period, Bax, Bcl<sub>2</sub>, Caspase-9 and p53 in ovarian tissue was measured by ELISA method.

**Results:** According to the results, Bax, Caspase-9 and p53 in the ovarian tissue of diabetic rats treated with concentrations of 50 and 100 mg/Kg of total flavonoid of *Avicennia marina* compared to the diabetic control group significantly decreased in a dose-dependent manner also Bcl<sub>2</sub> increased significantly. The amount of Bax, Caspase-9 and p53 in the ovarian tissue of the group treated with a concentration of 100 mg/Kg hydro alcoholic extract significantly decreased and the amount of Bcl-2 increased significantly compared to the diabetic control group. In the comparison between total flavonoid and hydro alcoholic extract at a concentration of 50, no significant difference was observed, but at a concentration of 100, total flavonoid compared to the hydroalcoholic extract caused significant changes in the investigated parameters.

**Conclusion:** Total leaf flavonoid of *Avicennia marina* is more effective in reducing apoptosis and p53 protein in ovarian tissue of type 1 diabetic rats compared to *Avicennia marina* hydro alcoholic extract.

### Keywords:

*Avicennia marina*,  
apoptosis, Diabetes,  
ovarian tissue, p53,  
Rat

**How to Cite this Article:** Rahbarian R, Ataei GH. Comparison of the effect of hydroalcoholic extract and flavonoid of *Avicennia marina* leaves on Bax, Bcl<sub>2</sub>, Caspase-9 and p53 in ovarian tissue of type 1 diabetic rats. Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. 2023;11(2):46-55.