مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه
دوره ۱۱. شماره ۲. تابستان ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

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

راهله رهباریان*[۱]، غزال عطایی[۲]

۱. استادیار،دانشکده علوم،گروه زیست شناسی، 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 می باشد. فلاونوئیدهای گیاه حرا از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کند بنابراین تنش اکسیداتیو ناشی از بیماری های مختلف از جمله دیابت را مهار می نمایند. 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 الایزا سنجش شد.

نتایج: با توجه به نتایج به‌دست 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 به‌صورت وابسته به دوز تزریقی به‌طور معنی‌داری کاهش و میزان Bcl-2 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). 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 به‌طور معنی‌داری کاهش و میزان Bcl-2 به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). در مقایسه بین فلاوونوئید کل و عصاره هیدروالکلی در غلظت ۵۰ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی در غلظت ۱۰۰، فلاونوئید تام نسبت به عصاره هیدروالکلی تغییرات معنی داری را در پارامترهای مورد بررسی ایجاد نمود ($p>۰/۰۵$).

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

کلید واژه‌ها:
گیاه حرا، آپوپتوزیس، دیابت، بافت تخمدان،P53، موش صحرایی

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

***آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه پیام نور،گروه زیست شناسی، دانشکده پیام نور**
آدرس پست الکترونیک: a_rahbarian@pnu.ac.ir

مقدمه

دیابت قندی از نظر بالینی یکی از شـــایع‌ترین بیماری های غدد درون‌ریز ا ست. کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری با عوارض متابولیکی حاد و مزمن همراه می باشـــد (۱). بر اســـاس پیش‌بینی‌های به عمل آمده، در آینده شـــیوع بیماری دیابت در جامعه انســـانی افزایش خواهد یافت. در حال حاضـــر درمان اصـــلی و مؤثر برای دیابت قندی اســـتفاده از انســـولین و داروهای کاهنده گلوکز خون می‌باشـــد؛ ولی این ترکیبات دارای عوارض نامطلوب می‌باشند (۲).

علاوه بر عوارض شـــایع دیابت، مشـــخص شـــده اســـت دیابت با ایـجاد اختلالات مـتابولـیک، غدد درون‌ریز را تـحت تاثیر قرار می‌دهد و در عملکرد طبیعی محور های هورمونی اختلال ایجاد می‌کند (۳). همچنین از دیابت به‌عنوان یکی از علل ناباروری نام برده می‌شـــود زیرا تحقیقات نشـــان داده اســـت دیابت موجب اختلال در عملکرد تخمدان ازجمله اختلال در رشـــد فولیکولی، اختلال در بلوغ اووســـیت و کاهش تخمک‌گذاری می‌شـــود (٤). اســـترس‌اکســـیداتیو نقش کلیدی در بیماریی دیابت و اختلالات ناشـــی از آن ایفاء می‌کند و مشـــخص شـــده اســـت ســـطوح بالای گلوکز می‌تواند به تشـــکیل گونه های اکســـیژن فعال، افزایش اســـترس‌اکســـیداتیو و در نتیجه ســـبب آســـیب تخمدان و فولیکول‌های تخمدانی شـــود (٥). تحقیقات نشـــان داده اســـت استرس‌اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی سبب انباشت پروتئین P53در سیتوزول سلول‌های بتای پانکراس می‌شود. P53 سبب اختلال در عملکرد میتوکندری و افزایش اکســـیداســـیون گلوکز می شود. این امر سیگنالینگ تر شح ان سولین را کاهش می‌دهد. بنابراین کنترل P53 ســـیتوزولی احتمالا یک اســـتراتژی درمانی مهم برای پیشـــگیری و کاهش عوارض ســـلولی در مبتلایان به دیابت نوع یک می‌با شد (٦). از سوی دیگر نتایج تحقیقات حاکی از این مطلب است که هیپرگلیسمی از طریق افزایش بیان پروتئین P53 ســـبب القاء آپوپتوز در میوســـیت می‌شـــود (۷). همچنین تحقیقات پروتئین ســـرکوب کننده تومور P53 را به‌عنوان یک 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 شـــامل Bcl-2، Bcl-xl، Bax، Bad و خانواده کاسپاز تنظیم می‌شـــود. خانواده Bcl-2 می‌توانند هم نقش القایی و هم نقش مهاری در فرایند آپوپتوزیس داشـــته باشـــد (۹). آپوپتوزیس همانند تکثیر و تمایز، بخشـــی از فیزیولوژی ســـلول اســـت و در رشـــد طبیعی ســـلول‌ها و بافت‌ها و نیز جلوگیری از بیماری‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند. هنگامی که ســـلول تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی یا حتی درونی، ماذ ند برخی بی ماری های مـ تابول یک، پرتو های یونیزان، داروهای سایتوتوک سیک و غیره قرار می‌گیرد، ن سبت 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 کاســـپازها فعال می‌شـــوند (۱۰). مطالعات نشـان داده اسـت شـرایط اسـترس‌اکسـیداتیو می‌تواند محرکی برای شروع فرایند آپوپتوزیس با شد. همچنین مـشخص شـــده اســـت افزایش رادیـکال های آزاد اکســـیژن با الـقاء ا سترس‌اک سیداتیو و آ سیب اک سیداتیو DNA می‌توانند موجب شروع فرایند آپوپتوزیس شود (۱۱).

گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh از خانواده Avicenniaceae یکی از اعضـــاء گـیا هان مانگرو می‌باشـــد. گیاه حرا غنی از انواع فیتوالکســـین‌ها، اســـتروئیدها، اســـیدهای کربوکســـیلیک، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و تری‌ترپن ها می باشـــد (۱۲). فلاونوئـید ها بزرگترین گروه از پلی‌فنول‌ها می‌باشند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند و بر اســـاس ســـاخ تار مولکولی شـــا مل گروه های مختلفی از آنتو سیانین‌ها هستند. همچنین مـشخص شده ا ست که مـصرف گیاهان غنی از ترکیب‌های پلی‌فنول می‌تواند سطح آنتی‌اکسیدان‌ها را در خون افزایش دهد (۱۳). مطالعات نشـان داده اسـت تجویز برگ گیاه حرا به موش‌های صحرایی موجب کاهش سطح سرمی گلوکز می‌شـود (١٤). در پژوهشـی دیگر مشـخص شـده اسـت

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 (۱۷و۱۶). 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 ۵±۱۵۵ روز و محدوده وزنی ۴±۱۶۸ گرم در دمای محیطی ۴±۲۴ 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 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 غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید تام برگ گیاه حرا (HPLC, ≥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 به‌صورت داخل صفاقی، ۰/۵ میلی‌لیتر نرمال سالین به‌عنوان حلال دارو دریافت کردند. گروه‌های دیابتی تحت تیمار، به مدت ۳۰ روز و به‌صورت داخل صفاقی با ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی و یا با ۰/۵ میلی‌لیتر فلاونوئید تام برگ گیاه حرا تیمار شدند. غلظت عصاره و فلاوونوئید 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 ۳±۳۶ 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. به‌طوری که کاملا در الکل غوطه‌ور شود. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شد و پس از آن به‌کمک کاغذ صافی فیلتر شد. عصاره به‌دست آمده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرارداده 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 CX21FS1 (Olympus, Japan) 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) به‌میزان ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایجاد شد.

همچنین از بافر سیترات (pH=۵/٤) 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 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 بر دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد (۲۱).

پارامترهای پژوهش حاضر توسط روش ELISA، دستگاه الایزاریدر (Stat Fax-2100, USA) و کیت‌های ساخت شرکت فاین تست (China) سنجش شد. کیت Bcl-2 دارای حساسیت ۹/۳۷۵< پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/٦۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، کیت Bax دارای حساسیت ۰/۱۸۸< نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰-۰/۳۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر، کیت Caspase-9 دارای حساسیت ۰/۰۹٤< نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰-۰/۱۵٦ نانوگرم بر میلی‌لیتر و کیت P53 دارای حساسیت ٤٦/۸۷۵< پیکوگرم بر میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر و محدوده ۵۰۰۰-۷۸/۱۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بر میلی‌لیتر می‌باشد.

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

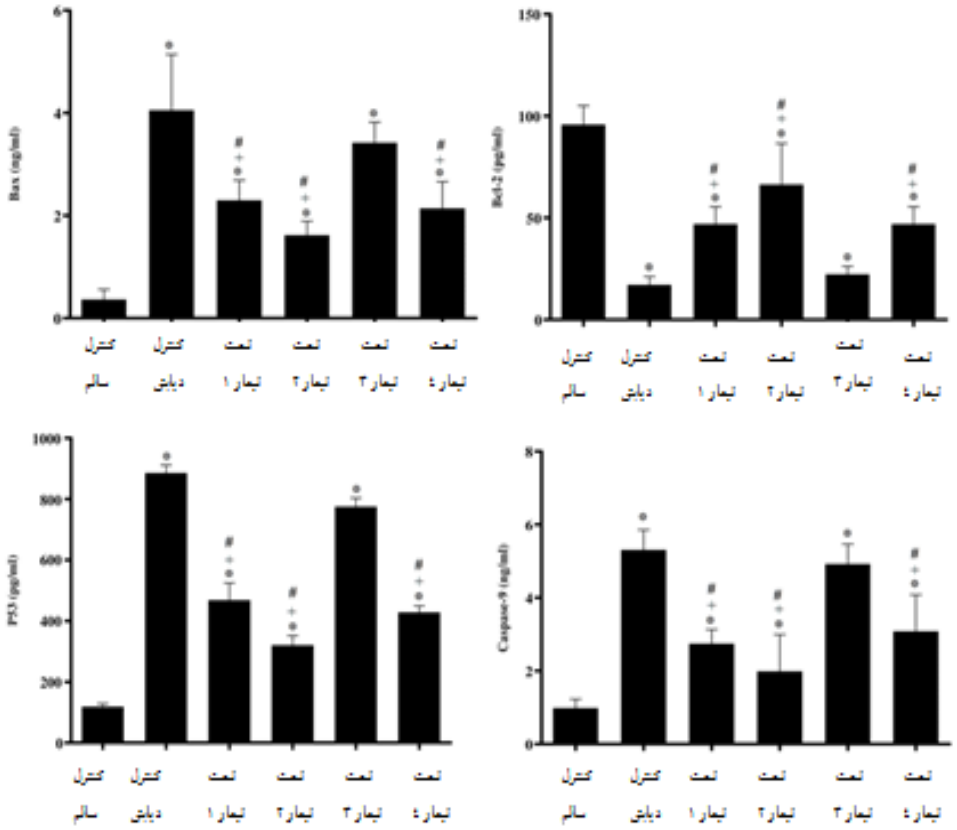
با توجه به این‌که نتایج به‌دست آمده کمی است، توسط آزمون کولموگوروف اسمیرنف فرض نرمال بودن توزیع فراوانی داده‌ها برقرار شد (p>۰/۰۵). داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تحلیل شد. همچنین نتایج به‌دست آمده به همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت خطای معیار میانگین±انحراف معیارگزارش شد.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

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<۰/۰۵). میزان Bax، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵).

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 به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵). 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 به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵).

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<۰/۰۵). 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<۰/۰۵). این مقایسه برای غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا اختلاف معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). (نمودار-۱).



نمودار ۱) میانگین میزان Bax، Bcl-2، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه. گروه دیابتی تحت تیماره 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 ٤)،

*$p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل

+$p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل دیابتی

$p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه مبتلا به دیابت تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فلاونوئید

بحث

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 موش های 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 Bax، Caspase-9 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، Caspase-9 و p53 در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی شده است. افزودن فلاوونوئید تام برگ گیاه و همچنین عصاره هیدروالکلی گیاه با غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب افزایش میزان Bcl-2 و کاهش میزان Bax، Caspase-9 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 فلاوودوئید تام گیاه با توجه

به نمودار تغییرات ایجاد شده در شاخص های مورد بررسی می توان گفت که عصـــاره فلاوونوئید تام در کاهش اثرات تخریبی دیابت موثر تر از عصاره هیدروالکلی گیاه عمل نموده است.

محققین گزارش کرده‌اند که افزایش اسـترس‌اکسـیداتیو متعاقب بیماری دیابت سـبب افزایش میزان ROS و کاهش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی می شود، در نتیجه آپوپتوز روی می‌دهد و سبب مرگ سـلول‌های تخمدانی می‌شـود (۱۸). همچنین گزارش شـده است افزایش مزمن قند خون در بیمار دیابتی سبب کاهش میزان گلوتـاتیون در میتوکنـدری، افزایش تولیـد رادیکـال‌هـای آزاد اکسیژن، فعال شدن کاسپازها و در نهایت القاء آپوپتوز می‌گردد (۱۹). از سـوی دیگر علت وقوع آپوپتوز در سـلول‌های تخمدان بیماران دیابتی نوع یک، علاوه بر افزایش اسـترس‌اکسـیداتیو، وقوع فرآیند التهابی و حضـور سـیتوکاین‌های التهابی اسـت. علاوه بر این التهاب سیستمیک سبب تولید نیتریک اکساید شده و در نهایت مرگ سلولی از نوع آپوپتوز در سلول‌های تخمدانی به وقوع می‌پیوندد (۲۰). محققین نشـــان دادند دیابت به‌طور مشـــخص بر بلوغ تخمک و تخمک‌گذاری تاثیر دارد و با القاء آپوپتوز در سـلول‌هـای گرانولوزا سـبب کوچکتر شـــدن فولیکول های تخمدانی می‌شـــود. همچنین تعداد فولیکول های آپوپتوزی افزایش می‌یابد (۲۱). همسـو با نتایج پژوهش حاضـر محققین نشـــان داده‌اند افزایش مزمن قند خون در موش های صحرایی مبتلا به دیابت نوع یک با افزایش نسبت Bax/Bcl-xL و Bax/Bcl-2 در نورون‌های هیپوکامپ همراه اسـت. به این ترتیب با افزایش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوزی و کاهش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مرگ سلولی در این سلول‌ها القاء می‌شـود. همچنین گزارش شـده اسـت سـطح بالای قند خون از طریق تولید و تجمع رادیکال های آزاد سـبب القاء آپوپتوز می‌شـود (۲۲). محققین گزارش کرده‌اند فعال شـدن مسـیر آپوپتوزیس در بافت بیضـه موش‌های صـحرایی 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 in vitro به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. همچنین گزارش شده است هیپرگلیسمی مزمن از یک سو می‌تواند سبب افزایش میزان پروتئین P53 شود و از سوی دیگر می‌توان با مهار بیان RNA پروتئین P53 محافظت قابل توجهی در برابر آپوپتوز ایجاد کرد (۲۴). در پژوهشـی دیگر محققین نشـان داده‌اند افزایش پروتئین P53 ناشی از دیابت می‌تواند روند پیری را در سلول‌های بنیادی اندوتلیال شـتاب دهد. همچنین محقیق فعال سـازی مسـیر سیگنالینگ P53 را به‌عنوان یک رویداد حیاتی که می تواند سبب اختلالات و عوارض گسـترده در مبتلا یان به دیابت شـود، شناسایی کرده‌اند (۲۵).

نتایج پژوهش حا ضر ن شان داد فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در مقایسـه با عصـاره هیدروالکلی آن در کاهش آپوپتوزیس و پروتئین p53 در بافت تخمدان موش‌های صـحرایی دیابتی نوع یک موثرتر اسـت. نتایج تحقیقات پیشـین بیانگر اثر محافظتی عصـاره برگ گیاه حرا بر بافت تخمدان موش‌های صـحرایی دیابتی می‌باشـد و گزارش شـده اسـت اسـتفاده از گیاه حرا می‌تواند در بهبود اختلالات هورمونی و آسیب بافت تخمدان در بیماران دیابتی موثر باشد (۱۶). نتایج پژوهشـی نشـان داد که عصـاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه حرا سـبب کاهش سـطح سـرمی قند خون در موش‌های صـحرایی دیابتی می‌شـود و نیز عصاره برگ گیاه حرا سبب افزایش مصرف گلوکز و یا کاهش آزادسـازی قندها از منابع ذخیره‌ای می‌شـود (۱۴). بنابراین می‌توان احتمال داد نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر ناشی از اثر هیپوگلیسـمی ترکیبات موجود در گیاه حرا می‌باشـد. با توجه به این‌که فلاونوئیدها یکی از بیشـترین پلی‌فنول‌های گیاه حرا اسـت (۲۶)، این ترکیبات می‌توانند سـبب مهار آپوپتوز، افزایش ترشـح انسـولین از طریق هیپرتروفی سـلول‌های بتا پانکراس، بهبود هیپرگلیسـمی از طریق تنظیم متابولیسـم گلوکز در سلول‌های هپاتو سیتی، کاهش مقاومت به انسولین و کاهش التهاب و اسـترس‌اکسـیداتیو می‌شـوند (۲۷). تحقیقات پیشـین گویای اثر فلاونوئیدها بر کاهش استرس‌اکسیداتیو و آپوپتوز در موش‌های دیابتی مبتلا به نفروپاتی اسـت (۲۸). محققین نشـان

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. به‌طوری 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). احتمالا گیاه حرا با کاهش التهاب در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی سبب کاهش آپوپتوزیس شده است.

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 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 این‌رو می‌توان به نقش فلاونوئید تام برگ گیاه حرا در کاهش آپوپتوز سلول‌های تخمدانی و احتمالا 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 منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

مشارکت نویسندگان:

(۱) مفهوم پردازی و طراحی مطالعه، یا جمع آوری داده ها، یا تجزیه و تحلیل و تفسیر داده ها :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

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, AbednatanziH. 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. Sadoughi1 D., Edalatmanesh M.A, Rahbarian R. Investigating the Effect of *Avicennia Marina* Aqueous Extract on Neuronal Density of Hippocampa 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 β-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, Esmaeili Sabzevar H. The Effect of Aqueous Extract of Mangrove Leaves (*Avicennia marina*) on Pituitary- Hormones of Gonadal Axis and Ovarian Follicle Numbers in Diabetic Rats. Armaghane-danesh. 2017; 22 (1): 1-17.

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.

Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences
2023, Volume 11, No. 2: 46-55.

Original article

Comparison of the effect of hydroalcoholic extract and flavonoid of *Avicennia marina* leaves on Bax, Bcl_2, Caspase-9 and p53 in ovarian tissue of type 1 diabetic rats

Raheleh Rahbarian [1*], Ghazal Ataei[2]

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

Keywords:

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

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_2, 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_2, 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_2 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.

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_2, 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.

Copyright © 2020 Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cite.