

## اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی

حوریه اسماعیلی سبزواری<sup>۱</sup>، راهله رهباریان<sup>۲</sup>، مسعود صالح‌مقدم<sup>۳</sup>، سید دامون صدوقی<sup>۳\*</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران

۳- دکتری تخصصی بیولوژی سلولی تکوین، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

### چکیده

**زمینه و هدف:** دیابت قندی استرس‌اکسیداتیو را افزایش و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را تضعیف می‌کند. همچنین برگ‌های گیاه حرا منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه به منظور تعیین اثر عصاره آبی برگ‌های گیاه حرا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی انجام شد.

**روش‌ها:** تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به گروه‌های مساوی (۸ تایی) شاهد، دیابتی، تیمار نشده و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ‌های گیاه حرا با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وارد شدند. دیابت در گروه دیابتی تیمار نشده و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره حرا، با یک‌بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان القاء شد. چرخه استروس موش‌های صحرایی توسط هورمون‌های جنسی یکسان شد. عصاره برگ‌های گیاه حرا یک روز در میان و به مدت یک ماه به صورت داخل صفاقی به گروه‌های دیابتی تحت تیمار تزریق گردید. محلول سالیین به حیوانات گروه شاهد و دیابتی تیمار نشده، تزریق و در پایان دوره تیمار، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت تخمدان اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** تجویز وابسته به دوز عصاره آبی برگ‌های گیاه حرا با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی دیابتی در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز، همچنین کاهش معنی‌دار مالون دی‌آلدئید شد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاکی از اثر وابسته به دوز عصاره گیاه حرا در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی است.

**کلمات کلیدی:** دیابت، گیاه حرا، تخمدان، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، موش صحرایی

\*آدرس نویسنده مسئول: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

آدرس پست الکترونیک: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

## مقدمه

استرس اکسیداتیو به علت عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها و یا در نتیجه تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن ایجاد می‌شود. در اغلب موارد تغییر در تعادل پرواکسیدان و آنتی‌اکسیدان موجب تشکیل پراکسید و آسیب بافتی می‌گردد (۱). مشخص شده است در بیماران مبتلا به دیابت مزمن افزایش قند خون یک سری از واکنش‌های آبشاری را القاء می‌کند که منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال واکنش‌گر اکسیژن<sup>۱</sup> و در نهایت موجب ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو سلولی می‌شود. این ترکیبات به علت داشتن قدرت واکنش شیمیایی بالا موجب صدمات سلولی و بافتی می‌شوند (۲).

استرس اکسیداتیو سلولی در مبتلایان به دیابت از طریق روش‌هایی همچون عدم تعادل اکسیداسیون و احیاء، افزایش فعالیت آلدوز ردوکتاز، افزایش محصولات نهایی گلیکوزیلاسیون، تغییر در فعالیت پروتئین کیناز C، اختلال در تعادل پروستاگلان‌ها و افزایش تولید سوپراکسیدهای میتوکندریایی القاء می‌شود (۳).

لیپیدها جزء مهم‌ترین مولکول‌هایی هستند که مورد تهاجم رادیکال‌های آزاد قرار می‌گیرند. این فرآیند منجر به پراکسیداسیون لیپیدها و در نهایت موجب کاهش حیات و مرگ سلولی می‌شود. در این میان غشای سلولی که غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع است، بیش از سایر قسمت‌های سلول به پراکسیداسیون حساس است (۴). پراکسیداسیون لیپیدها منجر به کاهش سیالیت غشاء و از بین رفتن ساختمان و عملکرد آن می‌شود. محصول نهایی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، مالون دی‌آلدئید<sup>۲</sup> است (۵).

در تمام سلول‌ها و بافت‌ها مولکول‌هایی به نام آنتی‌اکسیدان جهت حفظ هموستاز اکسیداتیو و مقابله با استرس اکسیداتیو وجود دارد. آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز<sup>۳</sup>، گلوکاتایون پراکسیداز<sup>۴</sup> و کاتالاز<sup>۵</sup> از جمله این مکانیسم‌های دفاع آنتی-اکسیدانی محسوب می‌شوند (۶). آنیون سوپراکسید توسط

سوپراکسید دیسموتاز به اکسیژن و پراکسید هیدروژن تبدیل می‌گردد. آنزیم کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز موجب تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن شده و تری‌پتید گلوکاتایون، تیول غیر پروتئینی اصلی موجودات هواری و فراوان‌ترین آنتی-اکسیدان غیر آنزیمی داخل سلولی می‌باشند (۷).

میزان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در بافت کلیه موش‌های دیابتی اندک بوده و در مقابل میزان مالون دی‌آلدئید، نیتريت و نیترات در بافت کلیه موش‌های دیابتی به حد زیادی مشاهده می‌شود (۸). مشخص شده است دیابت از طریق افزایش تجمع رادیکال‌های آزاد در نهایت موجب اختلال در تخمک‌گذاری می‌گردد (۹). امروزه با توجه به عوارض جانبی داروهای شیمیایی، مطالعه بر روی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی با هدف دستیابی به ترکیبات جدید و موثر در اولویت قرار گرفته است. از این رو استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان به‌ویژه آنتی-اکسیدان‌های طبیعی جهت جلوگیری از صدمات اکسیداتیو در بیماران دیابتی می‌تواند سودمند باشد.

گیاه حرا<sup>۶</sup> به صورت بوته یا درختچه با ارتفاع متغیر بین ۱ تا ۱۰ متر یافت می‌شود. پوسته این گیاه به رنگ سفید، خاکستری یا سبز مایل به زرد می‌باشد. برگ‌ها معمولاً به شکل بیضی یا نوک تیز بوده، در قسمت رویی حالت چرمی و به رنگ سبز روشن و در قسمت‌های زیرین به رنگ سفید مایل به خاکستری و پرزدار است. گیاه حرا مجموعه‌ای از گیاهان شورپسند و مقاوم به نمک دریا بوده و در قالب جنگل‌های جزر و مدی در امتداد سواحل شرقی آفریقا، جنوب، جنوب شرق و جنوب غرب آسیا، استرالیا و در حاشیه خلیج فارس در جزیره قشم، بندر خمیر، بندر گوآتر، بندر دیر و خلیج نایبند پراکندگی دارند (۱۰). این گونه دارای ترکیبات زیستی فعالی بوده و دارای فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی می‌باشد. همچنین گیاه حرا غنی از انواع فیتوالکسین‌ها، استروئیدها، اسیدهای کربوکسیلیک، تانن‌ها، فلاونوئیدها، ایریدوئیدها و تری‌ترین‌ها می‌باشد (۱۱).

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 (۱۲). در

<sup>1</sup> - Reactive oxygen species

<sup>2</sup> - Malondialdehyde

<sup>3</sup> - Superoxide dismutase

<sup>4</sup> - Glutathione

<sup>5</sup> - Catalase

<sup>6</sup> - *Avicennia marina*

برگ درخت حرا از سواحل شمالی جزیره قشم جمع‌آوری شد. سپس توسط بخش هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه پیام نور مرکز مشهد مورد شناسایی و تایید قرار گرفت. برگ گیاه حرا پس از طی مراحل خشک شدن در سایه در دمای  $35 \pm 5$  درجه سانتی‌گراد، توسط آسیاب خرد و عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد. ابتدا ۵۰ گرم بودر خشک شده برگ گیاه حرا داخل کاغذ کارتوش ریخته و در محل تعبیه شده دستگاه سوکسله قرار گرفت. سپس ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان حلال در داخل بالن دستگاه ریخته شد. آب مقطر توسط گرم‌کن دستگاه به جوش آمد و در نهایت جداسازی عصاره برگ گیاه حرا به این طریق انجام شد. پس از حدود ۱۰ ساعت مایع نسبتاً غلیظی در ته بالن جمع و با حذف حلال در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره تام استخراج شد (۱۹). لازم به ذکر است قبل از شروع پژوهش LD50 (متوسط دوز کشنده) و ED50 (متوسط دوز موثر) عصاره آبی برگ گیاه حرا مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم LD50 و محدوده بین ۳۰۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ED50 می‌باشد. به همین دلیل غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان غلظت‌های درمانی انتخاب شده است. موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی شامل گروه شاهد، گروه دیابتی تیمار نشده و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ گیاه حرا وارد شدند. حیوانات گروه شاهد و گروه دیابتی تیمار نشده به مدت یک ماه به‌صورت یک روز در میان به روش داخل صفاقی محلول سالین (شرکت داروسازی ثامن، ایران) دریافت نمودند. این عمل به‌منظور یکسان نمودن شوک حاصل از تزریق انجام گرفت. حیوانات گروه‌های دیابتی تحت تیمار به‌مدت یک ماه و یک روز در میان عصاره آبی برگ گیاه حرا را به‌صورت داخل صفاقی با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند. مدل تجربی دیابت در موش‌های صحرایی با یک بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان مونوهیدرات (Sigma-Aldrich، آلمان) به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ایجاد شد. همچنین از بافر سیترات ( $\text{pH} = 5/4$ ) به‌عنوان حلال آلوکسان استفاده گردید. آلوکسان به گروه دیابتی تیمار نشده و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با عصاره آبی برگ گیاه حرا تزریق شد. مطالعه بر روی دیابت مزمن می‌باشد، به همین دلیل حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان و القاء دیابت تجربی، جهت تأیید آن از ورید

طب سنتی از گیاه حرا جهت تسکین درد استفاده می‌شود و مشخص شده است که دارای اثرات سایتوتوکسیک، ضد سرطانی و ضد توموری نیز می‌باشد (۱۳). تجویز برگ گیاه حرا به موش‌های صحرایی منجر به کاهش سطح سرمی گلوکز می‌گردد (۱۲). همچنین فلاونوئیدهای گیاه حرا از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن جلوگیری می‌کنند (۱۴)، (۱۲). به‌علاوه عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا دارای اثرات ضد دردی (۱۵)، ضد التهابی (۱۶) و حفاظت‌کننده بافت‌های بدن در برابر ترکیبات سمی است (۱۷). ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی برگ گیاه حرا دارای اثر محافظتی بر بافت بیضه و روند اسپرم‌سازی در موش‌های صحرایی تیمار شده با تتراکلریدکربن دارد (۱۱). با توجه به روند رو به رشد استفاده از گیاهان دارویی و وجود ترکیبات بیولوژیکی فعال موجود در گیاه حرا، این پژوهش با هدف تعیین اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز، همچنین میزان مالون دی‌آلدئید بافت تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی، انجام شد.

## روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد در بهار سال ۱۳۹۵ انجام شد. در این مطالعه ملاحظات اخلاقی بر اساس روش‌های علمی استاندارد بوده و تمامی اعمال جراحی و نمونه‌گیری تحت بیهوشی کامل انجام شد. همچنین تمام مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور طراحی و اجرا شد. در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی از موش‌های صحرایی ماده نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات با وزن تقریبی ۱۷۰-۱۸۰ گرم از موسسه سرم‌سازی رازی مشهد تهیه و در دمای تقریبی ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۰-۳۵ درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (شرکت رازی راد، ایران) قرار داشتند و آب به مقدار کافی توسط بطری شیشه‌ای در اختیار آن‌ها قرار داده شد و از غذای فشرده مخصوص موش آزمایشگاهی با فرمولاسیون استاندارد (شرکت دانه‌اران توس، ایران) تغذیه نمودند. به‌منظور حصول حالت سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز پس از استقرار حیوانات به انجام رسید (۱۸).

ضرب گردید و میزان فعالیت آنزیم برحسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین بافتی (U/mg tissue protein) گزارش شد (۲۲).

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس تجزیه پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. واکنش با اضافه کردن ۳۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن به حجم مناسبی از هموژن بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=7) انجام شد. سپس جذب نوری طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر بررسی و فعالیت آنزیمی برحسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین بافتی (U/mg tissue protein) محاسبه شد (۲۳).

این روش اساس آن واکنش مالون‌دی‌آلدئید با تیوباربی‌توریک اسید در دمای جوش است. در این آزمایش مالون‌دی‌آلدئید با تیوباربی‌توریک اسید واکنش داده و رنگ صورتی ایجاد می‌شود. که بیشترین جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر است. این واکنش در pH ۲ تا ۳، دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. برای این کار از نمونه‌های سانتریفوژ شده به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر برداشته و به ۱/۵ میلی‌لیتر تری-کلرو استیک اسید و ۱/۵ میلی‌لیتر تیوباربی‌توریک اسید اضافه شد و تمامی نمونه‌ها و لوله‌های استاندارد با رقت‌های مختلف را به مدت ۸۰ دقیقه در بن‌ماری (Paatariyaco BS، ایران) ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا واکنش صورت گیرد. سپس محلول با ۳۰۰۰ دور و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و جذب نوری آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر در مقابل بلانک معرف توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Aqualytic AL800، آلمان) بررسی گردید. منحنی استاندارد براساس رقت‌های تترا اتوکسی پروپان تهیه و جذب‌های نوری به‌دست آمده با منحنی استاندارد تطبیق داده شد. نتایج به‌صورت نانومول در میلی‌گرم پروتئین بافتی (nmol/mg tissue protein) گزارش شد (۲۰).

اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۲۰ تحلیل شد. با توجه به این‌که نتایج به‌دست آمده کمی است، توسط آزمون کوموگروف اسمیرنوف فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد ( $p > 0.05$ ). جهت مقایسه میانگین بین گروه‌های مورد آزمایش از آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین نتایج به‌دست آمده به‌همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت خطای معیار میانگین  $\pm$  میانگین

دمی خون‌گیری صورت گرفت و قند خون توسط دستگاه گلوکومتر (EasyGluco، کره جنوبی) اندازه‌گیری شد. قندخون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد (۱۸).

در پایان دوره تیمار و به دنبال ۱۲ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با دی‌اتیل اتر (Merck، آلمان) بی‌هوش شدند و بافت تخمدان از بدن خارج شد. پس از شستشو با محلول سالین به همراه بافر تریس به مدت ۲ دقیقه با دستگاه هموژنایزر (IKA Ultra turrax T25 digital، آلمان) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه شد و محلول هموژنیزه شده، سانتریفوژ (Z366، آلمان) شد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد و از محلول ۰/۵ میلی‌مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (Sigma-Aldrich، آلمان) به عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بقیه محلول جدا شد، بخش زیرین رسوب کرده دور ریخته شد و از محلول شفاف رویی جهت سنجش استفاده گردید (۲۰).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت‌های شرکت راندوکس (Randox، انگلستان) و با کمک دستگاه فوتومتر بیوشیمی (Stat Fax 2100، آمریکا) اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. برای این منظور ۲ میلی‌لیتر از محلول برادفورد به ۴۰ میکرولیتر از محلول هموژنیزه بافتی اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس در طول موج ۵۹۵ نانومتر و در مقابل بلانک معرف، جذب آن بررسی شد. با انطباق درصد مهار روی منحنی استاندارد، فعالیت آنزیم به‌دست آمد و فعالیت آن برحسب واحد بین‌الملل در میلی‌گرم پروتئین بافتی (U/mg tissue protein) گزارش شد (۲۱).

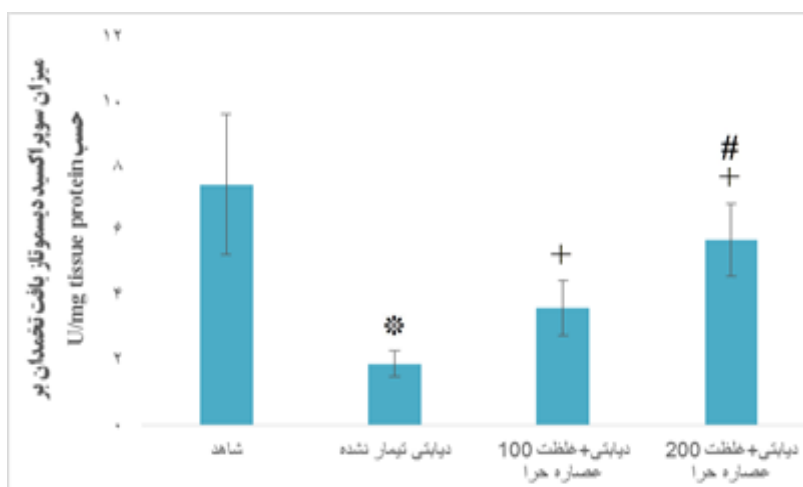
در این روش از کیت زلبایو (ZellBio، آلمان) استفاده شد. آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز واکنش اکسیداسیون گلوکوتایون را توسط کومن هیدروپراکسید کاتالیز می‌نماید. در حضور آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز و NADP، گلوکوتایون اکسید شده مجدداً به گلوکوتایون احیاء تبدیل می‌شود که این احیاء با اکسیداسیون هم-زمان NADPH<sup>+</sup> به NADP<sup>+</sup> همراه است. در این واکنش کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جذب به‌دست آمده در فاکتور قید شده در دستورالعمل کیت

در گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا به‌صورت وابسته به دوز به‌طور معنی‌داری افزایش و میزان مالون دی‌آلدئید کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). همچنین نتایج نشان داد فعالیت بافتی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز، نیز میزان مالون دی‌آلدئید بین گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

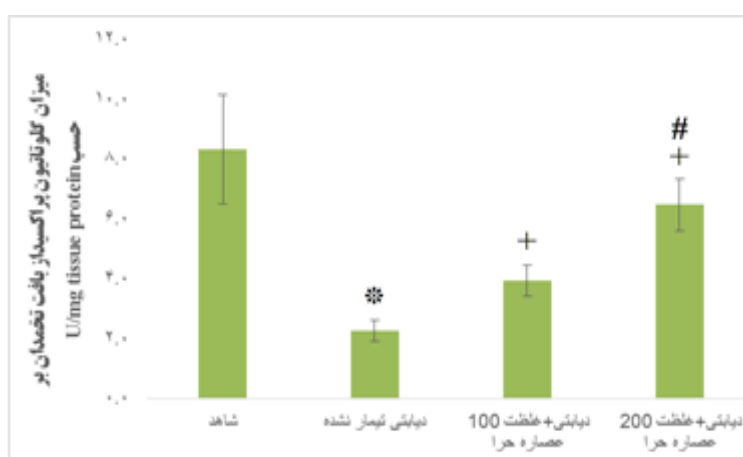
## نتایج

با توجه به نمودارهای ۱ تا ۴، میزان فعالیت بافتی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز، در گروه دیابتی تیمار نشده در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش و میزان مالون دی‌آلدئید افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده فعالیت بافتی آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز



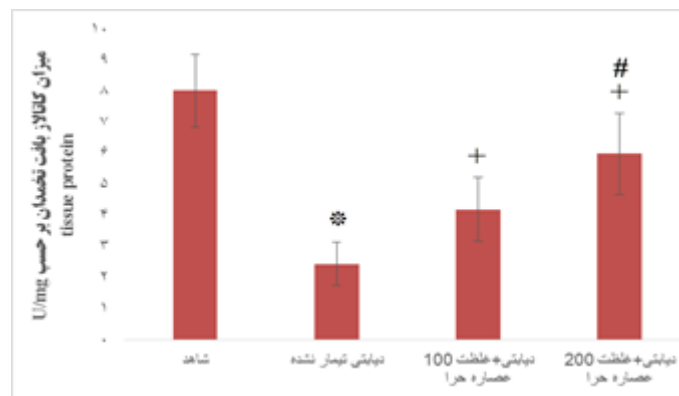
(\*)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه شاهد، (+)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، (#)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره حرا

نمودار ۱- اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر سطح سیتوپلاسمی سوپراکسید دیسموتاز بافت نخمدان موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه



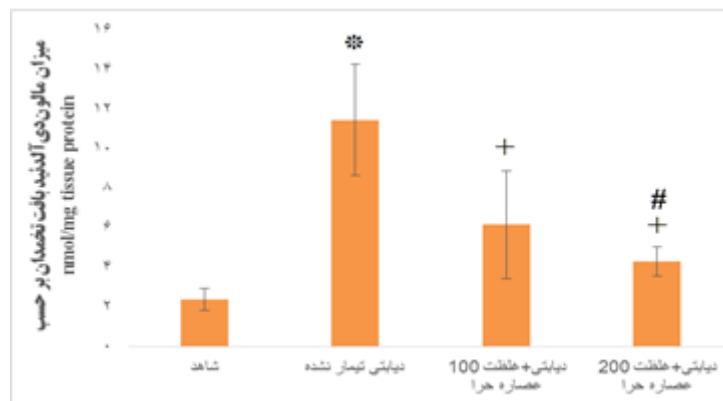
(\*)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه شاهد، (+)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، (#)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره حرا

نمودار ۲- اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر سطح سیتوپلاسمی گلوکاتایون پراکسیداز بافت نخمدان موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه.



نمودار ۳- اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر سطح سیتوپلاسمی کاتالاز بافت تخمدان موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه میلی گرم بر کیلوگرم عصاره حرا

(\*)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه شاهد، (+)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، (#)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰



نمودار ۴- اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر سطح سیتوپلاسمی مالون دی آلدئید بافت تخمدان موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه میلی گرم بر کیلوگرم عصاره حرا

(\*)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه شاهد، (+)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده، (#)  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰

## بحث

است و نیز گزارش شد دیابت مزمن با افزایش سطح رادیکال-های آزاد درون سلولی و تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن می‌تواند منجر به صدمه بافتی شده و در نهایت پراکسیداسیون لیپیدی و مقاومت به انسولین را افزایش دهد (۲۵). در پژوهش دیگری مشخص شد، دیابت فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز را نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. همچنین عنوان شده است کاتالاز که یکی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم در سم‌زدایی رادیکال‌های آزاد می‌باشد، در گروه دیابتی کاهش معنی‌داری می‌یابد (۲۶). گزارش شده است دیابت با افزایش قند خون و ایجاد شرایط استرس‌اکسیداتیو در پاتوژنز عوارض دیابت نقش مهمی دارد و این عوارض با افزایش سطح بافتی مالون دی‌آلدئید، نیتريت و نیترات و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی نمایان می‌شود (۲۷). این یافته‌ها با نتایج مطالعه مطابقت دارد، زیرا در موش‌های صحرایی دیابتی افزایش تجمع

در پژوهش حاضر اثر عصاره آبی برگ گیاه حرا بر فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز، همچنین میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت تخمدان موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع یک مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش مشخص شد در مقایسه با گروه شاهد، در گروه دیابتی تیمار نشده میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش و میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت تخمدان موش‌های صحرایی افزایش یافت. مشخص شده است کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت گویای تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و افزایش مالون‌دی‌آلدئید نشان‌دهنده پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد (۲۴). نتایج پژوهش مشابه حاکی از کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و نیز افزایش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید در گلبول‌های قرمز موش‌های صحرایی دیابتی

آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز، محافظت نماید (۳۰). در پژوهش دیگری مشخص شد ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در برگ گیاه حرا با خواص مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد می‌توانند بافت‌ها را در برابر استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند (۳۱).

به‌علاوه محققین نشان دادند ترکیبات موجود در عصاره گیاه حرا با جلوگیری از آزادسازی سیتوکین‌های التهابی فرایند التهاب را در بافت‌های مختلف مانند مفاصل کنترل می‌کند (۱۶). همچنین مشخص شده است عصاره آبی و هیدروالکلی برگ گیاه حرا دارای اثرات هیپوگلیسمیک در موش‌های صحرایی دیابتی است و گزارش شد عصاره برگ گیاه حرا سبب افزایش مصرف گلوکز و یا کاهش آزادسازی قندها از منابع ذخیره‌ای می‌شود (۱۲) که احتمالاً با کاهش عوارض دیابت موجب کاهش شرایط استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی شده است.

به‌طورکلی عصاره آبی برگ گیاه حرا نه تنها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی را افزایش می‌دهد، بلکه باعث کاهش غلظت مالون‌دی‌آلدئید بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. در نهایت پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری در مورد اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیبات گیاه حرا صورت گیرد. همچنین بررسی‌های بیشتری در زمینه شناسایی ترکیبات فعال و نیز سایر مکانیسم‌های موثر گیاه حرا در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت‌های مختلف ضروری است.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت تجویز وابسته به دوز عصاره آبی برگ گیاه حرا به موش‌های صحرایی ماده دیابتی نه تنها موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت تخمدان می‌شود، بلکه پراکسیداسیون لیپیدی را در بافت تخمدان کاهش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد ترکیبات موجود در عصاره برگ گیاه حرا با اثر حفاظتی خود منجر به کاهش استرس اکسیداتیو در تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم حوریه

رادیکال‌های آزاد منجر به تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی و در نهایت موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در بافت تخمدان می‌شود.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد تیمار موش‌های صحرایی دیابتی با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی برگ گیاه حرا در مقایسه با گروه دیابتی تیمار نشده به‌صورت وابسته به دوز منجر به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش مالون‌دی‌آلدئید بافت تخمدان موش‌های صحرایی شد. فلاونوئیدهای موجود در برگ گیاه حرا قادر به حذف هیدروپراکسیدهای لیپیدی و هیدروژن پراکسید بوده و در دفاع سلولی علیه استرس اکسیداتیو القاء شده توسط رادیکال‌های آزاد نقش اصلی را بر عهده دارد (۱۴). همچنین با حذف رادیکال‌های آزاد می‌توان سطح پلاسمایی وضعیت تام آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید (۲۸). لذا ترکیبات پلی‌فنولی و فلاونوئیدی گیاه حرا به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و ضد التهاب در سیستم‌های بیولوژیک بدن عمل می‌کند (۲۹). از این رو می‌توان با استفاده از ترکیبات گیاه حرا، میزان رادیکال‌های آزاد و تشکیل التهاب در بافت تخمدان موش‌های صحرایی دیابتی را مهار کرد. در راستای این نتایج مشخص شد ترکیبات گیاه حرا استرس اکسیداتیو را در موش‌های دیابتی کاهش می‌دهد (۱۲). به‌نظر می‌رسد در مطالعه حاضر عصاره آبی برگ گیاه حرا با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بافت تخمدان، توانسته است سطح رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی ناشی از دیابت را کاهش داده و از آسیب بافتی جلوگیری نماید. مطالعه‌ای با هدف تعیین اثر محافظتی عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا بر کبد موش‌های صحرایی نر القاء شده با تتراکلرید کربن انجام شد و نتایج نشان داد برگ گیاه حرا دارای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فلاونوئیدی زیادی است و این ترکیبات محافظت‌کننده بافت کبد در برابر اثرات توکسیک ترکیباتی نظیر تتراکلرید کربن می‌باشد. همچنین مشخص شد عصاره برگ گیاه حرا با مهار برهم‌کنش‌های شیمیایی رادیکال‌های آزاد ناشی از تتراکلرید کربن به‌عنوان آغازکننده استرس اکسیداتیو، با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و سرکوب روند التهاب بافت کبد، اثرات محافظتی خود را اعمال می‌کند (۱۷). نظر به این‌که فلاونوئیدها یکی از بیشترین پلی‌فنول‌های گیاه حرا است (۱۴)، این ترکیبات می‌توانند سلول‌ها را در برابر تخلیه گلوتاتیون احیاء، با افزایش ظرفیت آنزیم‌های

است. بدین وسیله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد سپاسگزاری و قدردانی می‌شود.

## References

- 1- Ceriello A, Testa R, Genovese S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016; 26 (4): 285 - 92.
- 2- Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2014;1840(9):2709-29.
- 3- Rashidi A, Kalalian Moghaddam H, Norouzi P. Effect of root kudzu on biochemical parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Knowledge & Health.* 2015;10(2):18-23.
- 4- Girotti AW, Korytowski W. Cholesterol as a natural probe for free radical-mediated lipid peroxidation in biological membranes and lipoproteins. *J Chromatogr B.* 2016;1019:202-9.
- 5- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338(1):668-76.
- 6- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.
- 7- Karam Sichani S, Naghsh N, Razmi N. Effects of Alcoholic Extract of *Peganumharmala L.* on Malondialdehyde Concentration and Catalase and Glutathione Peroxidase Activity in Mice Treated with Nanosilver Particles. *J Mazand Univ Med Sci.* 2012;22(95):10-17. [In persian]
- 8- Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Roghani Dehkordi F. Effect of chronic administration of Silymarin on oxidative stress markers in renal tissue of diabetic Rats. *J Gorgan Uni Med Sci.* 2012;14(2):10-16. [In persian]
- 9- Agarwal A, Allamaneni SSR. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(3):338-47.
- 10- Patel NT, Gupta A, Pandey AN. Salinity tolerance of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh from Gujarat coasts of India. *Aquat Bot.* 2010;93(1):9-16.
- 11- Soleimani Z, Mirazi N. The Effect of *Avicennia marina* hydroethanolic leaf extract on testes tissue and spermatogenesis in male rats induced with carbon tetrachloride. *Armaghane danesh.* 2015;20(8):677-88. [In persian]
- 12- 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. [In persian]
- 13- Itoigawa M, Ito C, Tan HT-W, Okuda M, Tokuda H, Nishino H, et al. Cancer chemopreventive activity naphthoquinones and their analogs from *Avicennia* plants. *Cancer Lett.* 2001;174:135-9.
- 14- Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM. New flavonoids from *Avicennia marina*. *Fitoterapia.* 2000;71(3):274-7.
- 15- Zamani Gandomani M, Forouzandeh Malati E. Antinociceptive effect of extract of mangrove (*Avicennia marina*) in male rats. *MJTUOMS.* 2014;36(1):34-9. [In persian]
- 16- Zamani Gandomani M, Forouzandeh Molaali E, Zamani Gandomani Z, Madani H, Jamal



- Moshtaghian S. Evaluation of Anti-inflammatory effect of hydroalcoholic extract of mangrove (*Avicennia marina*) leaves in male rats. MJTUOMS. 2012;34(4):80-5. [In persian]
- 17- Gholami M, Mirazi N. Study of hepato protective effects of *Avicennia marina* hydro ethanolic leaves extract in male rats induced with carbone tetrachloride. Armaghane danesh. 2016;20(10):858-72. [In persian]
- 18- Sadoughi SD, Chamipa M. Effects of aqueous extract of *Holothuria arenicola* and low frequency electromagnetic field on serum insulin, glucose and beta-amyloid ( $A\beta 1-42$ ) in diabetic rats. Feyz. 2016;20(1):1-10. [In persian]
- 19- Sepehri-Moghadam H, Rahbarian R, Sadoughi SD. The effect of aqueous extract of *Launaea acanthodes* (Boiss.) O. Kuntze on the serum level of insulin and blood glucose and histomorphological changes of pancreas in diabetic rats. Feyz. 2015;19(1):30-7. [In persian]
- 20- Malek-Mohammadi R, Roghani M, Salami M. The effect of aqueous extracts of *Melissa officinalis* on the oxidative stress indices in the midbrain tissue. Feyz. 2015;19(1):8-14. [In persian]
- 21- Roghani M, Baluchnejadmojarad T, Roghani Dehkordi F. Effect of chronic administration of Silymarin on oxidative stress markers in renal tissue of diabetic Rats. J Gorgan Uni Med Sci. 2012;14(2):1-16. [In persian]
- 22- Sameni H, Kavakebian F, Tabriziamjad M, Bandegi A, Yousefi B, Taherian A. Effects of hydroalcoholic extract of Propolis on oxidative stress indices of rat fetal brain induced by chronic prenatal stress. koomesh. 2014;15(4):482-92. [In persian]
- 23- Kazemi A, Zarei Mahmoudabadi A, Fasihi ramandi M, Rasouli Vani, Saberi M. Evaluating oxidative stress factors induced by chlorpyrifos poisoning in plasma of Wistar rat. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2014;22(2):1079-89. [In persian]
- 24- Khosrowbaki A. The role of oxidative stress in male infertility: A review. AMUJ. 2013;15(9):94-103. [In persian]
- 25- Rahbarian R, Sepehri-Moghadam H, Sadoughi SD. The Effects of Aqueous Extract of *Launaea acanthodes* on Oxidative Stress Parameters of Red Blood Cells in Diabetic Rats. J Rafsanjan Univ Med Sci. 2016;14(10):865-78. [In persian]
- 26- Salimnejad R, Jalali M, Nikravesh MR, Fazel AR. Effect of Garlic Aqueous Extract on Markers of Oxidative Stress in Diabetic Rats Testes. J Rafsanjan Uni Med Sci. 2014;13(4):371-82. [In persian]
- 27- Roghani M, Arbab-Soleymani S. The effect of oral feeding of *tribulus terrestris* fruit on some markers of oxidative stress in the brain of diabetic rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2013;21(2):127-35. [In persian]
- 28- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. Plant Science. 2012;196:67-76.
- 29- Wang Y, Zhu H, Yee Tam NF. Effect of a polybrominated diphenyl ether congener (BDE-47) on growth and antioxidative enzymes of two mangrove plant species, *Kandelia obovata* and *Avicennia marina*, in South China. Marine Poll Bull. 2014;85(2):376-84.
- 30- Chu Y, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. J Agric Food Chem. 2002;50(23):6910-6.
- 31- Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Ghanbari Z, Ghanbari M, et al. Anti-oxidative effect of Citro flavonoids on spermatogenesis in rat. Afr J Pharm Pharmacol. 2011;5(6):721-5.

## ***Effect of Aqueous Extract of Mangrove Leaves (*Avicennia marina*) on Antioxidant Enzyme Activities of Ovarian Tissue in Diabetic Rats***

Hurieh Esmacili Sabzevar<sup>1</sup>, Raheleh Rahbarian<sup>2</sup>, Masoud Saleh Moghadam<sup>2</sup>, Seyed Damoon Sadoughi<sup>3\*</sup>

1- MSc Student in Biochemistry, Department of Biology, Faculty of Sciences, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

3- PhD of Developmental Cell Biology, Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

**\*Corresponding Address: Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.**

**Email Address: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir**

### ***Abstract***

**Background & Aim:** Diabetes mellitus increases oxidative stress and result in weakening of the antioxidant defense system. Leaves of mangrove (*Avicennia marina*) are rich in antioxidant compounds which have been less studied. This study was conducted to determine the effect of aqueous extract of mangrove leaves (*Avicennia marina*) on antioxidant enzyme activities of ovarian tissue in diabetic rats.

**Methods:** 32 female Wistar rats were divided into equal groups (n=8) of control, diabetic non-treated, and diabetic treated with 100 and 200 mg/kg of aqueous extract of mangrove leaves. Diabetes was induced in the diabetic non-treated group and diabetic treated groups with mangrove extract using an intraperitoneal (IP) injection of alloxan. Estrous cycle in rats was made identical by sex hormones. Aqueous extract of mangrove leaves injected into diabetic groups undergoing treatment every other day for one month. Saline solution was injected into the animals of control and non-treated diabetic groups. At the end of the treatment, antioxidant enzymes activity of ovarian tissue was measured.

**Results:** Dose-dependent administration of aqueous extract of mangrove leaves with concentrations of 100 and 200 mg/kg to diabetic rats significantly increased enzymes activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase, while significantly decreased malondialdehyde compared to the non-treated diabetic group (p<0.05).

**Conclusion:** The results show the dose-dependent effect of *Avicennia marina* in increase of the activity of antioxidant enzymes and decrease of the lipid peroxidation in diabetic rat's ovarian tissue.

**Keywords:** Diabetes, *Avicennia marina*, Ovary, Antioxidant enzymes, Rat