مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۳، تیر ۱۳۹۳، ۳۸۲-۳۷۱

بررسی اثر عصاره آبی سیر بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی

رامین سلیم‌نژاد[۱]، مهدی جلالی[۲]، محمدرضا نیکروش[۳]، علیرضا فاضل[۳]

دریافت مقاله: ۹۲/۱۱/۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۲/۱۲/۲۴ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۳/۳/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۳/۴/۳

چکیده

زمینه و هدف: دیابت قندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیکی بوده و از طریق افزایش استرس اکسیداتیو باعث ایجاد آسیب بیضه می‌شود. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها باعث کاهش استرس اکسیداتیو شده و میزان آسیب بیضه را کاهش می‌دهند. در این مطالعه تأثیر عصاره سیر بر میزان شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر به طور تصادفی به ۳ گروه، کنترل، دیابتی و دیابتی تیمار شده با عصاره سیر تقسیم شدند. گروه کنترل و دیابتی به میزان ۱ میلی‌لیتر بر ۱۰۰ گرم وزن بدن آب مقطر وگروه دیابتی تیمار شده با عصاره سیر نیز به میزان ۱ میلی‌لیتر بر ۱۰۰ گرم وزن بدن عصاره سیر به مدت ۶ هفته دریافت کردند. دیابت از طریق تزریق داخل صفاقی تک دوز استرپتوزوتوسین (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ایجاد شد. بعد از ۶ هفته بیضه راست خارج شد و فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو شامل مالون‌دی‌آلدئید، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: درمان موش‌های صحرایی دیابتی با عصاره سیر به طور معناداری باعث کاهش سطح گلوکز خون گردید ($p<۰/۰۰۱$). همچنین، در طی دیابت مقدار مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافته و میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در بافت بیضه کاهش نشان داد و طی درمان با عصاره سیر، به طور معناداری بهبودی در این عوامل مشاهده گردید ($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه تأییدکننده نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره سیر در بهبود آسیب‌های بیضه‌ای ناشی از دیابت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: استرس اکسیداتیو، دیابت شیرین، عصاره سیر، بیضه

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه آموزشی علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استاد گروه آموزشی علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
تلفن: ۸۰۰۲۴۹۱-۰۵۱۱، دورنگار: ۸۰۰۲۴۸۴-۰۵۱۱، پست الکترونیکی: jalalim@mums.ac.ir
۳- استاد گروه آموزشی علوم تشریح و بیولوژی سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

مقدمه

دیابت قندی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های متابولیکی است که با افزایش قند خون به دلیل نقص در تولید انسولین (دیابت نوع I) و یا مقاومت بافت‌های محیطی به انسولین به همراه کاهش ترشح انسولین از سلول‌های بتای جزایر لانگرهانس لوزالمعده (دیابت نوع II) مشخص می‌شود [۲-۱]. میزان افراد مبتلا به دیابت در جهان درحال افزایش است و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۵ حدود ۳۰۰ میلیون نفر در جهان مبتلا به دیابت باشند [۲]. دیابت تأثیرات ساختاری و عملکردی متفاوتی بر ساختارهای مختلف بدن دارد و در درازمدت با عوارض چشمی، کلیوی، قلبی- عروقی و عصبی همراه می‌باشد [۳]. همچنین مطالعات بالینی و آزمایشگاهی نشان داده‌اند که دیابت بر روی سیستم تناسلی نر تأثیر گذاشته و باعث ایجاد عوارضی مانند کاهش میزان تستوسترون، کاهش قطر لوله‌های منی‌ساز، کاهش میل جنسی، افزایش اسپرم‌های ناهنجار و ناباروری می‌شود [۳-۲]. همچنین بیان شده است که احتمالاً دیابت یکی از عوامل ایجادکننده استرس اکسیداتیو می‌باشد [۴].

درطی دیابت، هایپرگلیسمی و در نهایت افزایش گلیکوزیلاسیون مولکول‌ها تغییر در فعالیت پروتئین کیناز C، برهم زدن تعادل پروستانوئیدها و افزایش تولید سوپراکسیدهای میتوکندریایی باعث افزایش استرس اکسیداتیو به واسطه افزایش در تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود [۵]. رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی هستند که به دلیل داشتن الکترون‌های جفت نشده، در بدن بسیار واکنش‌پذیر بوده و آسیب بسیاری به ماکرومولکول‌های بدن مانند DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها وارد می‌سازند [۶]. در شرایط طبیعی در بدن بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرایند منجر به بروز استرس اکسیداتیو و تغییرات پاتولوژیک متعدد در سلول‌ها می‌گردد [۷]. برخی از مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی عوارض ناشی از دیابت را کاهش می‌دهد [۸]. با توجه به میزان شیوع بالا و اثرات جانبی که دیابت بر روی سیستم تولید مثلی جنس نر دارد، لازم است که به دنبال راه‌هایی برای کنترل این بیماری و اثرات جانبی آن باشیم.

گیاهان دارویی از زمان‌های قدیم مورد توجه پزشکان بوده و از آن‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. سیر یکی از گیاهانی است که استفاده زیادی در طب سنتی از جمله درمان دیابت دارد. سیر (Allium sativum L, Liliaceae) دارای خواص مختلفی از جمله کاهش‌دهنده کلسترول و تری‌گلیسرید، کاهش‌دهنده فشار خون، جلوگیری از تشکیل توده پلاکتی خون، اثرات ضد میکروبی، ضد دیابتی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [۹]. سیر دارای مواد دارویی مؤثری همچون آلئین، آلیسین، آنزیم آلیناز، اینولین، ویتامین‌های C ، گروه B و A است [۱۰] خواص دارویی سیر عمدتاً به دلیل حضور ترکیب سولفوره آن به نام آلیسین می‌باشد. تحقیقات انجام شده نشان داده‌اند که آلیسین رادیکال‌های آزاد را به دام انداخته و پراکسیداسیون لیپیدی و تجمع پلاکتی را مهار کرده و میزان چربی‌های خون را کاهش می‌دهد [۱۱]. اکثر

مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از سیر باعث افزایش میزان تستوسترون، قطر توبول‌های منی‌ساز و نیز کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود [۱۳-۱۲]. در مطالعه‌ای که توسط Abdolahnejad و همکاران در رابطه با اثر سیر بر آسیب‌های بیضه‌ای ناشی از دیابت شیرین در موش‌های صحرایی انجام شد، بررسی‌های بافت شناسی نشان دادند که عصاره سیر خام با دوز ۱ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن به طریقه گاواژ به طور قابل توجهی تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده به وسیله دیابت و کم شدن سلول‌های زاینده را کاهش می‌دهد [۱۴]. Demerdash و همکاران در سال ۲۰۰۵ به مطالعه‌ای تأثیر بیوشیمیایی سیر و پیاز بر میزان قند خون ناشی از دیابت القا شده با آلوکسان پرداختند و نشان دادند که آب سیر و پیاز اعمال آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌هایپرگلیسیمیک دارد و می‌تواند آسیب‌های کبدی و کلیوی ناشی از دیابت را کاهش دهد [۹]. با توجه به این که در مطالعات قبلی تأثیر عصاره آبی سیر بر میزان شاخص‌های استرس اکسیداتیو بیضه موش‌های صحرایی دیابتی بررسی نشده است در مطالعه حاضر این بخش مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد روش‌ها

حیوانات: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰تا۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات از خانه حیوانات دانشکده پزشکی مشهد تهیه گردیده و در همین محل در شرایط استاندارد (دمای ۲۲-۲۴°C با چرخه نور/تاریکی ۱۲ ساعت) نگه داری شدند و در طول دوره آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

عصاره‌گیری: عصاره سیر بر اساس روشی که توسط Demerdash توصیف شده بود، تهیه گردد [۹]. جوانه سیر تازه (بومی‌منطقه مشهد) خریداری شده و توسط متخصصین گیاه‌شناسی در دانشگاه فردوسی مشهد با شماره هرباریوم (FUMH: 39493) تعیین گردید. ابتدا پوست سیر گرفته شده و با آب مقطر شستشو داده شد. سپس به قطعات کوچکی برش داده و به ازای هر ۱۰۰ گرم سیر خرد شده ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و با استفاده از مخلوط کن به خوبی مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ صافی صاف گردیده و عصاره ی سیر به لوله‌های آزمایش انتقال داده شد و تا زمان استفاده در فریزر نگهداری شد.

ایجاد دیابت: دیابت از طریق تزریق داخل صفاقی تک دوز استرپتوزوتوسین (STZ) محلول در سالین فیزیولوژیک (ساخت شرکت سیگما آمریکا) با دوز۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ایجاد شد. به این منظور موش‌های صحرایی به مدت ۱۲ ساعت ناشتا بوده و پس از آن تزریق صورت گرفت [۱۴]. سه روز پس از تزریق برای اطمینان از دیابتی شدن خونگیری از ورید دمی‌انجام شد. حیواناتی که میزان قند خون آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بودند به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. میزان قند خون حیوانات با دستگاه گلوکومتر (Easy Gluco) اندازه‌گیری شد.

گروه‌های مورد مطالعه: ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به سه گروه ۸ تایی کنترل، دیابتی و دیابتی تحت درمان با عصاره سیر تقسیم شدند. گروه کنترل و دیابتی آب مقطر به میزان ۱میلی‌لیتر بر ۱۰۰

گرم وزن بدن و گروه دیابتی تحت درمان با عصاره سیر نیز به میزان ۱میلی‌لیتر بر ۱۰۰ گرم وزن بدن (۴۰۰میلی‌گرم به ازای هر صد گرم) عصاره سیر به صورت روزانه و به مدت ۶ هفته به طریقه گاواژ دریافت کردند. در طول انجام مطالعه از موش‌های صحرایی قبل از شروع آزمایش و در هفته‌های سوم و ششم خون‌گیری از ورید گوشه چشمی جهت اندازه‌گیری تغییرات میزان سطح گلوکز انجام شد. تمام مراحل خون‌گیری بعد از ناشتا بودن موش‌های صحرایی به مدت ۱۲ساعت بود. بلافاصله بعد از خونگیری نمونه‌های خون سانتریفیوژ شده و سرم آن‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگه‌داری شد. بعد از گذشت ۶ هفته موش‌های صحرایی بیهوش شده و بیضه راست خارج شد و پس از هموژن کردن بیضه‌ها فعالیت آنزیم‌های استرس اکسیداتیو شامل ، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) مورد بررسی قرار گرفت.

سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA) بافتی: جهت تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، سطح TBARS ترکیبات واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید در بافت بیضه اندازگیری گردید. (TBARS)، مانند مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با TBA واکنش داده و کمپلکس قرمز رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۵۳۵nm دارای پیک جذبی است.

جهت تهیه محلول TBA-TCA-HCL، ۳۷۵ میلی‌گرم تیوباربیتوریک اسید (TBA) در ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک حل شده و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۱۵ درصدی تری‌کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شده، جهت حل شدن کامل رسوبات از حمام آب ۵۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. سپس بافت مورد نظر توزین و بلافاصله با محلول کلرید پتاسیم ۱/۵٪ هموژن گردید تا یک مخلوط هموژن ۱۰٪ بدست آید. سپس ۱ میلی‌لیتر از مخلوط هموژن بافتی با ۲ میلی‌لیتر از محلول TBA-TCA-HCL مخلوط شده و به مدت ۴۵ دقیقه در آب در حال جوش حرارت داده شد (محلول به رنگ نارنجی صورتی). بعد از خنک شدن، به مدت ده دقیقه با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید و سپس جذب آن (A) در طول موج ۵۳۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد [۱۶]. و در نهایت با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید

غلظت TBARS C(m)=A/1.65*10^5

سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز(SOD): جهت تهیه هموژن بافتی ابتدا بافت را وزن کرده و با بافر فسفات سالین ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۴) هموژن شد. سنجش فعالیت براساس روش madesh صورت گرفت. در این روش واکنش MTT با آنیون سوپراکسید تولید شده از پیروگالل، توسط آنزیم SOD مهار می‌گردد. ابتدا محلول استاندارد آنزیم که از شرکت راندوکس خریداری شده بود با بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۴) به غلظت‌های مختلف تهیه و منحنی استاندارد رسم گردید. سپس ۶۵ میکرولیتر بافر فسفات سالین (pH=۷/۴)، ۳۰ میکرولیتر MTT (۱/۲۵ میلی‌مول) در حضور ۷۵ میکرولیتر پیروگالل (۱۰۰ میکرومول) با ۱۰ میکرولیتر هموژن بافتی مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس ۰/۷۵ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه گردیده

و جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا خوانده شد.

برای به دست آوردن درصد مهار انجام شده با آنزیم SOD، از فرمول مربوطه بر اساس دستورالعمل کیت استفاده شد. با انطباق درصد مهار روی منحنی استاندارد فعالیت آنزیم به دست آمد و فعالیت آن بر اساس واحد بین‌المللی بر میلی‌گرم پروتئین تام گزارش شد [۱۷].

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): جهت تهیه هموژن بافتی ابتدا بافت را وزن کرده و با بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) هموژن شد. فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Aebi [۱۸] و با دنبال نمودن تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. واکنش با اضافه کردن H_2O_2 ۳۰ میلی‌مولار به حجم مناسبی از هموژن بافتی در بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷) شروع شد. سپس جذب طی ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت و فعالیت ویژه برحسب واحد بر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری گلوکز: غلظت گلوکز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون ایران و به روش گلوکز اکسیداز توسط دستگاه اتوآنالیزر اندازه‌گیری گردید.

روش تجزیه و تحلیل آماری: تمام تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵انجام شدند. تمام مقادیر به صورت (انحراف معیار ± میانگین) بیان شدند. در نهایت داده‌ها با استفاده از آزمون‌های ONE- WAY ANOVA و به دنبال آن TUKEY مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایجی که دارای $p<۰/۰۵$ بودند از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

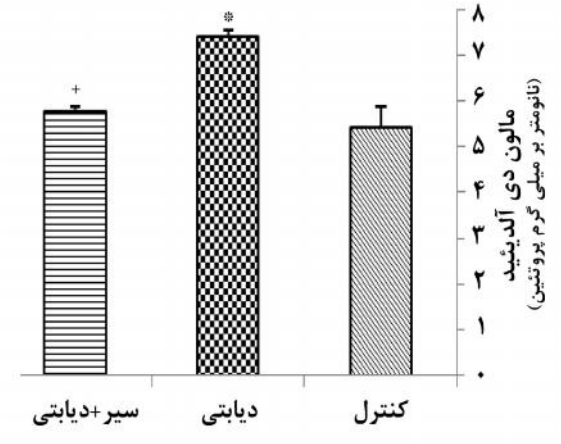
جدول ۱ متوسط گلوکز سرم را قبل از شروع آزمایش (پایه) و در طی هفته‌های سوم و ششم نشان می‌دهد. افزایش معناداری در سطح گلوکز سرم در طی هفته‌های سوم و ششم در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل ($p<۰/۰۰۱$) دیده شد. همچنین کاهش معناداری در سطح گلوکز سرمی‌طی هفته‌های سوم و ششم در گروه دیابتی تحت درمان با عصاره سیر نسبت به گروه دیابتی ($p<۰/۰۰۱$) مشاهده گردید.

جدول ۱- مقایسه میانگین گلوکز سرم قبل از آزمایش، در هفته سوم و ششم

گلوکز (میلی‌گرمبردسی‌لیتر) گروه‌ها	گلوکز پایه (انحراف معیار ± میانگین)	گلوکز هفته سوم (انحراف معیار ± میانگین)	گلوکز هفته ششم (انحراف معیار ± میانگین)
گروه کنترل(C)	۹۹/۷۸±۴/۱۳	۱۲۱/۹۱±۳/۵۷	۱۲۴/۲۹±۴/۳۸
گروه دیابتی (D)	۴۴۹/۰۰±۶/۵۴	۴۶۲/۵۵±۷/۵۰*	۵۱۳/۴۵±۷/۳۳ *
گروه دیابتی با سیر (D+G)	۴۰۹/۵۰±۹/۰۲	۲۱۲/۶۸±۷/۹۶+	۱۶۶/۴۰±۸/۱۰ +

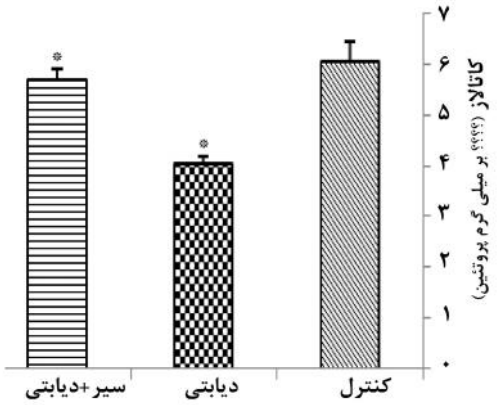
**** نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل و + نشان دهنده اختلاف معنادار بین گروه دیابتی و تحت درمان با عصاره سیر می‌باشد (p<۰/۰۰۱). (آزمون آنالیز واریانس یک طرفه)***

نمودار ۱ میزان مالون‌دی‌آلدئید را در بافت بیضه نشان می‌دهد. سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی افزایش معناداری را نسبت به گروه کنترل (p<۰/۰۰۱) نشان داد. درمان موش‌های صحرایی دیابتی با عصاره سیر باعث کاهش در سطح مالون‌دی‌آلدئید به طور معناداری (p<۰/۰۰۱) گردید.



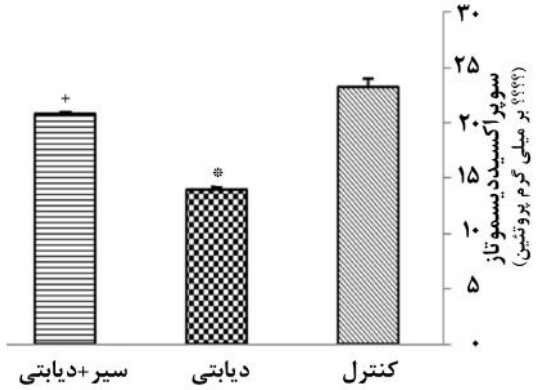
نمودار ۱- مقایسه سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در بافت بیضه موش‌های صحرایی پس از ۶ هفته بین گروه‌های کنترل، دیابتی و دیابتی تحت درمان با عصاره سیر (انحراف معیار ± میانگین). * نشان‌دهنده اختلاف معنادر با گروه کنترل و + نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه دیابتی و تحت درمان با عصاره سیر می‌باشد (p<۰/۰۰۱). (آزمون آنالیز واریانس یک طرفه)

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل (p<۰/۰۰۱) دارد. همچنین میانگین فعالیت این آنزیم در گروه تحت درمان با عصاره سیر افزایش معناداری را نسبت به گروه دیابتی بدون درمان (p<۰/۰۰۱) نشان داد (نمودار ۲) .



نمودار ۲- مقایسه فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت بیضه موش‌های صحرایی پس از ۶ هفته بین گروه‌های کنترل، دیابتی و دیابتی تحت درمان با عصاره سیر (انحراف معیار ± میانگین). * نشان‌دهنده اختلاف معنادر با گروه کنترل و + نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه دیابتی و تحت درمان با عصاره سیر می‌باشد (p<۰/۰۰۱). (آزمون آنالیز واریانس یک طرفه)

بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نشان داد که در گروه دیابتی میانگین فعالیت این آنزیم نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری (p<۰/۰۰۱) دارد. مقایسه یین گروه تحت درمان با گروه دیابتی افزایش معناداری را در میزان میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (p<۰/۰۰۱) نشان داد (نمودار ۳).



نمودار ۳- مقایسه فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بافت بیضه موش‌های صحرایی پس از ۶ هفته بین گروه‌های کنترل، دیابتی و دیابتی تحت درمان با عصاره ی سیر(میانگین±انحراف معیار). * نشان‌دهنده اختلاف معنادر با گروه کنترل و + نشان‌دهنده اختلاف معنادار بین گروه دیابتی و تحت درمان با عصاره سیر می‌باشد (p<۰/۰۰۱). (آزمون آنالیز واریانس یک طرفه)

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره سیر باعث ایجاد تغییراتی در سطح گلوکز خون و همچنین سطح آنزیم‌های استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. استفاده از عصاره ی سیر باعث کاهش میزان گلوکز خون در موش‌های صحرایی دیابتی تحت درمان شد که این یافته منطبق با نتایج حاصل از مطالعه Demerdash می‌باشد [۹]. مکانیسم دقیق کاهش قند خون توسط سیر مشخص نیست، ولی عمدتاً فعالیت هیپوگلیسمی‌سیر را به اجزای آلیسین آن نسبت می‌دهند. آلیسین این فرآیند را از طریق افزایش ترشح انسولین آندوژن، آزاد کردن انسولین از پیوندها و یا افزایش حساسیت بافت هدف به انسولین انجام می‌دهد. همچنین گزارش شده است که آلیسین می‌تواند فعالیت انسولین را از طریق ترکیب با اجزایی مانند سیستئین افزایش دهد [۱۹]. احتمالاً در مطالعه حاضر نیز اجزای آلیسین موجود در عصاره سیر با مکانیسمی مشابه باعث کاهش میزان گلوکز خون در موش‌های صحرایی دیابتی گردیده است. در طی دیابت علاوه بر افزایش میزان گلوکز، تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد نیز برهم می‌خورد. در نتیجه میزان رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می‌شود [۹-۸]. استرس اکسیداتیو از طریق مکانیسم‌هایی مانند پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب اکسیداتیو پروتئین و DNA باعث آسیب سلولی می‌شود [۲۰]. نتایج حاصل از مطالعه ی حاضر نشان داد که دیابت باعث افزایش معنادار سطح مالون‌دی‌آلدئید (به عنوان مارکر پراکسیداسیون لیپیدها) در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی نسبت به گروه کنترل می‌شود، که این یافته با مطالعات مختلفی که در ارتباط با استرس اکسیداتیو در بافت بیضه موش‌های صحرایی دیابتی انجام شده است مطابقت دارد [۴]. لذا افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید در بافت بیضه گروه دیابتی تأکیدی بر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. در مطالعه حاضر، درمان موش‌های صحرایی دیابتی با عصاره سیر، کاهش معناداری را در سطح مالون‌دی‌آلدئید بافت بیضه نشان داد. در رابطه با مکانیسم اثر عصاره سیر در جلوگیری و کاهش روند پراکسیداسیون، مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که تیوسولفینات‌های موجود در سیر (مثل آلیسین) به دام اندازنده‌های رادیکال‌های آزاد بوده و باعث مهار پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود [۱۱]. نتایج حاصل از مطالعه Hfaiedh و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ که به بررسی اثر مهاری عصاره سیر بر استرس اکسیداتیو ناشی از القا با لیندان (پودر سفید بلورین مورد استفاده به عنوان یک حشره‌کش در کشاورزی) و آسیب‌های مرتبط در بیضه و مغز موش‌های صحرایی پرداختند، نشان داد که تزریق روزانه سیر تازه به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن موش‌های صحرایی به صورت روزانه و به مدت ۳۰ روز، تغییرات ناشی از لیندان را تقریباً به حالت عادی بر می‌گرداند، و سطح مالون‌دی‌آلدئید را کاهش می‌دهد، که این عمل می‌تواند تأییدکننده نقش مفید این گیاه به عنوان یک آنتی‌اکسیدان باشد [۱۲]. بنابراین کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید بافت بیضه در گروه تحت درمان با عصاره سیر در مطالعه حاضر نیز احتمالاً مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در سیر از جمله تیوسولفینات‌ها می‌باشد. همچنین در مطالعه حاضر

مشخص شد، دیابت فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را نسبت به گروه کنترل به طور معناداری کاهش داده است، که این یافته با دیگر مطالعات انجام شده در این زمینه منطبق بوده و آن‌ها نیز بیان کرده‌اند که در طی دیابت، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز کاهش می‌یابد [۴]. سوپراکسید دیسموتاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن می‌باشد، عمل اصلی سوپراکسید دیسموتاز تجزیه رادیکال‌های آنیونی سوپراکسید (اولین محصول رادیکالی اکسیژن) به H_2O_2 می‌باشد، که از این طریق سمیت سوپراکسید از بین رفته و رادیکال‌های آزاد ناشی از سوپراکسید ایجاد نمی‌شود [۲۱]. از طرف دیگر در مطالعه حاضر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در بیضه موش‌های صحرایی دیابتی تحت تیمار با عصاره سیر افزایش معناداری را نسبت به گروه دیابتی بدون درمان نشان داد. این یافته تأییدکننده نتایج حاصل از مطالعه Ola-Mudathir و همکاران در سال ۲۰۰۸ می‌باشد، آن‌ها بیان کردند که درمان با عصاره آبی سیر و پیاز اثرات مخرب ناشی از کادمیوم را بر روی فعالیت اکسیداتیو بافت بیضه کاهش داده و باعث افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود [۱۳]. یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی که در سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد نقش دارد، کاتالاز می‌باشد. در مطالعه حاضر فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد، در حالی که در گروه تحت درمان با عصاره سیر فعالیت این آنزیم افزایش معناداری را نسبت به گروه دیابتی داشت. کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل افزایش تولید H_2O_2 در نتیجه خود اکسایشی گلوکز و گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی آن باشد که باعث اکسید شدن و دناتوره شدن آنزیم می‌شود و یا می‌تواند در نتیجه هیپرگلیسمی و به دنبال آن گلیکوزیلاسیون آنزیم اتفاق افتاده باشد که باعث مهار فعالیت آنزیم می‌شود [۲۲]. مشخص شده است که استفاده از مواد آنتی‌اکسیدان باعث افزایش فعالیت کاتالاز می‌شود که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد. گزارش شده است مصرف سیر به میزان ۳٪ وعده غذایی به مدت ۲ هفته تولید H_2O_2 را در کلیه کاهش می‌دهد [۲۳]. در مطالعه حاضر نیز احتمالاً عصاره سیر با مکانیسم فوق باعث افزایش فعالیت کاتالاز در گروه تحت درمان شده است. مکانیسم‌های احتمالی دخیل در بهبود آسیب‌های بیضه‌ای توسط عصاره سیر در موش‌های صحرایی دیابتی در مطالعه حاضر را می‌توان این‌گونه بیان کرد: سیر دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، کاهندگی قند خون و افزایندگی ترشح انسولین می‌باشد [۱۹، ۹]. در طی دیابت افزایش رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون لیپیدها شده و باعث آسیب در بافت بیضه می‌شود. سیر با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش استرس اکسیداتیو و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و باعث کاهش آسیب‌های بیضه می‌شود، از این نظر عصاره سیر مشابه آب انار، ملاتونین و بادام هندی عمل می‌کند. در این خصوص نشان داده شده است که تیمار موش‌های دیابتی با آنتی‌اکسیدان‌های فوق باعث کاهش سطح مالون‌دی‌آلدئید و افزایش فعالیت کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌شود [۲۵-۲۴، ۲۱]. همچنین بیان شده است سیر توسط مکانیسم‌هایی باعث افزایش

ترشح انسولین می‌شود [۱۹]. می‌توان این‌گونه بیان کرد که سیر با افزایش ترشح انسولین باعث کاهش قند خون شده و در نتیجه با این مکانیسم نیز باعث کاهش آسیب‌های بیضه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اثرات عصاره آبی سیر بر میزان شاخص‌های استرس اکسیداتیو بیضه موش‌های صحرایی دیابتی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق تأییدکننده نقش آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی عصاره سیر در بهبود آسیب‌های بیضه‌ای ناشی از دیابت می‌باشد. توصیه می‌شود که در تحقیقات آتی اثرات دوزهای مختلف سیر بر سیستم تناسلی جنس نر دیابتی بررسی گردد و مناسب‌ترین دوز جهت استفاده تعیین گردد.

تشکر و قدردانی

این پروژه با شماره ۹۱۰۸۵۷ مورد تأیید معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد قرار گرفت، بدینوسیله مجریان این طرح، از مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت تأمین اعتبار مالی و خانم آقایی مسئول آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده پزشکی مشهد جهت کمک در تهیه عصاره سیر تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

[1] Sreemantula S, Kilari EK, Vardhan VA, Jaladi R. Influence of antioxidant (L-ascorbic acid) on tolbutamide induced hypoglycemia/antihypergly cemia in normal and diabetic rats. *BMC Endocr Disord* 2005; 5(1): 2

[2] Agbaje I, Rogers D, McVicar C, McClure N, Atkinson A, Mallidis C, et al. Insulin dependant diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Hum Reprod* 2007; 22(7): 1871-77.

[3] Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. *J Androl* 2012; 33(2): 145-53.

[4] Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A. *Mol & Integr Physiol* 2003; 135(4): 539-47.

[5] Eskandari A, Heidari R, Farokhi F, Salimi Z, Ghasemi Z. Effect of aqueous extract from rhizome of Cynodon dactylon L. pers on renal and hepatic catalase activity and testicular histopathology in diabetic rats. *Feyz* 2012; 16(1): 9-16. [Farsi]

[6] Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol* 1995; 49(10): 1341-48.

[7] Naik S. Antioxidants and their role in biological functions: An overview. *Indian Drugs* 2003; 40(9): 501-16.

[8] Maritim A, Sanders R, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003; 17(1): 24-38.

[9] El-Demerdash F, Yousef M, El-Naga N. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol*. 2005; 43(1): 57-63.

[10] Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *J Chromatogr* A 2006; 1112(1): 3-22

[11] Isaacsohn JL, Moser M, Stein EA, Dudley K, Davey JA, Liskov E, et al. Garlic powder and plasma lipids and lipoproteins: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *Arch Intern Med* 1998; 158(11): 1189-94.

[12] Hfaiedh N, Murat J-C, Elfeki A. Protective effects of garlic (Allium sativum) extract upon lindane-induced oxidative stress and related damages in testes and brain of male rats. *Pesticide Biochem Physiol* 2011; 100(2): 187-92.

[13] Ola-Mudathir KF, Suru SM, Fafunso MA, Obioha UE, Faremi TY. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium-induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food Chem and Toxicol* 2008; 46(12): 3604-11.

[14] Abdolahnejad A, Gol A, Dabiri Sh. Garlic effects on reproductive complications of diabetes mellitus in male rats. *Physiol and Pharmacol* 2009; 13(3): 297-307. [Farsi]

[15] Sadik NA. Effect of diallyl sulfide and zinc on cadmium-induce oxidative damage and trace elements level in the testes of male rats. *J Food Biochem* 2008; 32(5): 672-91.

[16] Baluchnejad mojarad T, Roghani M, Mafakheri M. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. *Neurosci lett* 2010; 480(3): 206-10.

[17] Jadhav S, Sarkar S, Tripathi H. Cytogenetic effects of a mixture of selected metals following subchronic exposure through drinking water in male rats. *Indian J Exp Biol* 2006; 44(12): 997-05.

[18] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-26.

[19] Hfaiedh N, Murat JC, Elfeki A. Compared ability of garlic (Allium sativum) extract or α-tocopherol+ magnesium association to reduce metabolic disorders and oxidative stress in diabetic rats. *Phytother Res* 2011; 25(6): 821-27.

[20] Tremellen K. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 2008; 14(3): 243-58.

[21] Ukwenya V, Ashaolu O, Adeyemi D, Obuotor E, Tijani A, Biliaminu A, et al. Evaluation of

antioxidant potential of methanolic leaf extract of Anacardium Occidentale (Linn) on the testes of streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Eur J Anat* 2013; 17(2): 72-81.

[22] Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004; 25(4): 612-28.

[23] Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Olivares-Corichi IM, Granados-Silvestre MadlA, Hernández-Pando R, et al. Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: relation to antioxidant enzymes. *Free Radical Biol Med* 2000; 29(7): 622-11.

[24] Armagan A ,Uz E, Yilmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin induced diabetic rat testis. *Asian J Androl* 2006; 8(5): 595-00.

[25] Türk G, Sönmez M, Aydin M, Yüce A, Gür S , Yüksel M, et al. Effects of pomegranate juice consumption on sperm quality, spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male rats. *Clin Nutr* 2008; 27(2): 289-96.

Effect of Garlic Aqueous Extract on Markers of Oxidative Stress in Diabetic Rats Testes

R. Salimnejad[1], M. Jalali[2], M.R. Nikravesh[3], A.R. Fazel[3]

Received: 25/01/2014 Sent for Revision: 15/03/2014 Received Revised Manuscript: 31/05/2014 Accepted: 24/06/2014

Background and Objective: Diabetes mellitus is one of the most prevalent metabolic diseases and causes testicular damage by rising oxidative stress. Using antioxidants reduces oxidative stress and the amount of testicular damage. In this study, the effect of garlic extract on markers of oxidative stress in diabetic rats testes has been studied.

Materials and Methods: In this experimental study, 24 male Wistar rats were randomly divided into three groups: Control, Diabetic and Diabetic with garlic extract. Control and diabetic groups received distilled water (1ml/100g BW) and diabetic with garlic extract received garlic extract (1ml/100g BW,equivalent to 400 mg/100 g BW) for 6 weeks. Diabete was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin at a dosage of 60 mg/kg BW. After 6 weeks, the right testis removed and activity of oxidative stress enzymes including malondialdehyde (MDA), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were studied.

Results: Treatment of diabetic rats with garlic extract significantly reduced blood glucose levels ($p<0.001$). Also during diabete, the level of MDA enzymes activity was increased and the level of SOD and CAT enzymes activity decreased in the testes. Treatment with the garlic extract significantly improved these parameters ($p<0.001$).

Conclusion: The results of this study confirm the antioxidant role of garlic extract on improving the testicular damage caused by diabete.

Key words: Oxidative Stress, Diabetes Mellitus, Garlic Extract, Testis

Funding: This research was funded by Mashhad University of Medical sciences.

Conflict of Interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Mashhad University of Medical Sciences approved the study.

How to cite this article: Salimnejad R, Jalali M, Nikravesh MR, Fazel AR. Effect of Garlic Aqueous Extract on Markers of Oxidative Stress in Diabetic Rats Testes. *J RafsanjanUniv Med Sci* 2014; 13(4): 371-82. [Farsi]

1- MS Student. Anatomy and Cell Biology Department, Medical Faculty, Mashhad University of Medical sciences, Mashhad, Iran
2- Prof., Anatomy and Cell Biology Department, Medical Faculty, Mashhad University of Medical sciences, Mashhad, Iran (Corresponding Author): Tel: (0511) 8002491, Fax: (0511) 8002484, E-mail: JalaliM@mums.ac.ir
3- Prof., Anatomy and Cell Biology Department, Medical Faculty, Mashhad University of Medical sciences, Mashhad, Iran