DOI: 10.22092/vj.2019.125167.1555
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر کروسین بر هورمون‌های محور هیپوفیز– تخمدان در مدل موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک

• **تکتم سادات وفا (نویسنده مسئول)**
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
• **مژده عمادی**
استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۴-۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۰۷-۰۲
Email: vafa_toktam@yahoo.com

چکیده

دیابت ملیتوس یک بیماری متابولیک است که با اختلال در عملکرد غدد اندوکرین سبب بروز اختلالات باروری می‌شود. با توجه به نقش کروسین در تعدیل سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، هدف از این مطالعه تعیین اثر کروسین بر هورمون‌های محور هیپوفیز- تخمدان در مدل موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک انجام شد. در این مطالعه تجربی، ۲۸ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به ۴ گروه مساوی تقسیم شدند. گروه‌های شاهد، شاهد دیابتی و دو گروه دیابتی تحت تیمار با کروسین (غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم). دیابت در گروه‌های شاهد دیابتی و دیابتی تحت تیمار، با یک‌بار تزریق داخل صفاقی آلوکسان القاء شد. چرخه استروس موش‌های صحرایی توسط هورمون‌های جنسی یکسان شد. کروسین به مدت ۲۵ روز به‌صورت داخل صفاقی به گروه‌های دیابتی تحت تیمار تزریق شد. به حیوانات گروه‌های شاهد و شاهد دیابتی محلول سالین تزریق شد. در پایان دوره تیمار، غلظت سرمی *FSH*، *LH*، استروژن و پروژسترون توسط روش الایزا اندازه‌گیری شد. تحلیل آماری توسط آزمون‌های *One-way ANOVA* و تعقیبی *Tukey* انجام شد. در مقایسه با گروه شاهد دیابتی، تجویز وابسته به دوز کروسین با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم غلظت سرمی هورمون‌های *FSH*، *LH*، استروژن و پروژسترون را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($p<0/05$). نتایج این آزمایش نشان داد کروسین با افزایش سطح سرمی هورمون‌های *FSH*، *LH* استروژن و پروژسترون احتمالا موجب بهبود اختلالات هورمونی در بیماران دیابتی می‌شود.

کلمات کلیدی: کروسین، *FSH*، *LH* استروژن، پروژسترون، موش صحرایی

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 121-127

Effect of crocin on hormones of pituitary-ovarian axis in type one diabetic rat's model

By: Vafa. T.S., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran. and Emadi. M., Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran.

Received: 2019-07-19 **Accepted: 2019-09-24**

Email: vafa_toktam@yahoo.com

Diabetes mellitus is a metabolic disease that causes reproductive disorders by dysfunction of the endocrine glands. Due to the role of crocin in modulation of antioxidant defense system, the aim of this study was to determine the effects of crocin on hormones of pituitary-ovarian axis in type one diabetic rat's model. In this experimental study, 28 wistar female rats were allocated into 4 equal groups. Groups of control, diabetic control and two treated diabetic group with crocin (concentrations of 50 and 100 mg/kg). The diabetes in diabetic control and treated diabetic groups was induced using an intraperitoneal injection of alloxan. Estrous cycle in rats was identical by sex hormones. Crocin was intraperitoneally injected into treated diabetic groups for 25 days. Saline solution was injected to the animals of control and diabetic control groups. At the end of treatment period, the serum levels of LH, FSH, estrogen and progesterone was measured by ELISA. The statistical analysis was carried out using one-way ANOVA and Post Hoc Tukey tests. In comparison with diabetic control group, dose-dependent administration of crocin with concentrations of 50 and 100 mg/kg was significantly increased serum levels of LH, FSH, estrogen and progesterone ($p<0.05$). Based on results, crocin probably improves endocrine disorders in patients with diabetes by increases serum levels of LH, FSH, estrogen and progesterone.

Keyword: Crocin, FSH, LH, Estrogen, Progestrone, Rat

مقدمه

محور هیپوفیز-گناد یکی از ضروری‌ترین و فعال‌ترین محورهای فیزیولوژیك بدن است که نه‌تنها اعمال تولید مثلی، بلکه به‌واسطه سنتز و ترشح آندروژن‌ها، بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیکی فرد از جمله تمایز جنسی، بروز صفات ثانویه جنسی و رفتار جنسی را کنترل می‌کند (۲). هیپوتالاموس هورمون آزاد کننده گنادوتروپین (GnRH) ترشح می‌کند و با تنظیم عملکرد بخش قدامی هیپوفیز، میزان ترشح هورمون محرک فولیکولی (FSH) و هورمون لوتئینی کننده (LH) را تعدیل می‌نماید. FSH و LH در جنس ماده موجب فعال‌سازی تخمدان‌ها در جهت تولید پروژسترون، استروژن و اینهیبین و نیز موجب تنظیم قاعدگی و سیکل تخمدانی می‌شود (۳).دیابت شیرین که در نتیجه کمبود ترشح انسولین یا اختلال در اثربخشی انسولین ایجاد می‌شود، یک اختلال شایع اندوکرین است که با تغییرات نامطلوب در سطح سرمی گلوکز خون نمایان می‌شود. همچنین این بیماری بسیاری از اندام‌ها و مکانیسم‌های فیزیولوژیک طبیعی بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. از عوارض مزمن می‌توان به رتینوپاتی، نفروپاتی، بیماری‌های نورولوژیك، بیماری‌های قلبی عروقی، بیماری‌های پوستی، زخم در اندام‌های تحتانی و ناباروری اشاره کرد. اختلال در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها از عوارض شایع دیابت شیرین می‌باشد که به دنبال فقدان یا کاهش چشمگیر ترشح انسولین ایجاد می‌شود (۱).

طی تحقیقات انجام شده کاهش باروری در موش‌های صحرایی ماده دیابتی، ناشی از اختلال در هیستوفیزیولوژی تخمدان است و به صورت اختلال در رشد فولیکولی، افزایش تحلیل فولیکولی، تحلیل جسم زرد، عدم بلوغ اووسیت، کاهش یا عدم تخمک‌گذاری نمایان می‌شود (۴). از سوی دیگر افزایش قند خون موجب کاهش فعالیت ترشحی و اختلال در مسیر طبیعی محور هیپوفیز – تخمدان می‌شود (۵). مشخص شده است در نتیجه دیابت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن تضعیف شده و توانایی بدن در برابر آسیب‌های اکسیداتیو کاهش می‌یابد (۶). از سوی دیگر هیپرگلیسمی ناشی از دیابت میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را افزایش می‌دهد و در نتیجه گلیکوزیله شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی میزان فعالیت آن‌ها کاهش می‌یابد (۷). همچنین دیابت با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی منجر به کاهش عملکرد تخمدان می‌شود (۸). تحقیقات نشان داد عملکرد استروژن و پروژسترون، تنظیم سیکل قاعدگی، تنظیم بارداری، شیردهی و میل جنسی، آماده‌سازی رحم جهت لانه‌گزینی در زمان لقاح، حفظ دیواره رحم در طول بارداری و تحریک و توسعه غدد پستانی می‌باشد. بنابراین هرگونه اختلال در تنظیم محورهای هورمونی و نیز اختلال در سنتز و ترشح هورمون‌های جنسی می‌تواند موجب اختلالاتی در سیستم تولید مثلی و ناباروری شود (۹).

www.SID.ir

Archive of SID

گیاهان دارویی به دلیل اثرات جانبی کمتر، از چند دهه پیش به‌عنوان جایگزینی مناسب برای داروهای شیمیایی به منظور کاهش عوارض دیابت، مورد توجه قرار گرفته اند و مصرف آن‌ها در جهان رو به افزایش است. زعفران (Crocus sativus L.) گیاهی چند ساله و از خانواده زنبق (Iridaceae) است که در طب سنتی به اثرات مفید آن پی برده‌اند و انتهای خامه و کلاله سه شاخه آن مورد استفاده قرار می گیرد. طعم تلخ زعفران ناشی از وجود ماده‌ای به نام پیکروکروسین است. این ماده طی فرآوری به آلدئیدی معطر به نام سافرانال تبدیل می‌شود. کروسین گلیکوزیدی متشکل از کاروتنوئیدی به نام کروستین و قند است که رنگ زعفران را ایجاد می‌کنند. کروسین، کروستین و سافرانال به‌عنوان جزء بیولوژیکی اصلی و فعال زعفران شناخته می‌شوند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و قابلیت از بین برندن رادیکال‌های آزاد را دارند (۱۰). همچنین این ترکیبات می‌توانند منجر به کاهش قابل ملاحظه آسیب‌های اکسیداتیو در بافت‌های ایسکمیك شوند (۱۱). مشخص شده است کروسین با اثر محافظتی و آنتی‌اکسیدانی خود موجب کاهش آسیب بافت بیضه ناشی از تزریق سیکلوفسفامید می‌شود (۱۲). زعفران بر طیف وسیعی از تومورها از جمله لوکمی، کارسینوم تخمدان و پستان، آدنوکارسینوم روده بزرگ، رابدومیوسارکوما، پاپیلوما و کارسینوم سلول سنگفرشی اثر مهاری دارد (۱۳). همچنین تحقیقات اثرات ضد درد و ضد التهاب عصاره زعفران را نشان داده است (۱۴). کروسین در بیماری دیابت و کاهش عوارض کلیوی دارای نقش حفاظتی بوده و سطوح سرمی گلوکز، اوره و کراتینین را در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد اثرات ضد دیابتی کروسین ناشی از خواص آنتی‌اکسیدانی آن است (۱۵). همچنین مشخص شد کروسین از طریق مهار استرس‌اکسیداتیو و کاهش اکسیداسیون لیپیدها در جلوگیری از نفروپاتی دیابتی نقش دارد (۱۶).

به‌طور کلی دیابت با ایجاد شرایط استرس‌اکسیداتیو موجب تغییر فعالیت محورهای هورمونی و کاهش میزان ترشح هورمون‌های جنسی می‌شود. با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی کروسین، هدف از انجام این پژوهش تعیین اثر کروسین بر هورمون‌های محور هیپوفیز- تخمدان در مدل موش‌های صحرایی دیابتی نوع یک می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۸ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با محدوده وزنی ۸±۱۶۵ گرم و سن تقریبی ۴±۹۵ روز از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه پیام نور مرکز مشهد تهیه و در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در دمای ۳±۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴±۳۵ درصد و دوره روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات شفاف (رازی راد، ایران) نگهداری شدند. در طول آزمایش موش ها از غذای فشرده مخصوص موش با فرمول استاندارد (دانه‌داران توس، ایران) تغذیه نمودند و آب به مقدار کافی توسط بطری پلاستیکی ۵۰۰ میلی‌لیتر در اختیار آن‌ها قرار داده شد. مدت زمان ۱۵ روز بعنوان دوره سازش حیوانات مورد آزمایش با محیط و شرایط آزمایش‌ها در نظر گرفته شد (۱۷). موش‌های صحرایی مورد آزمایش به‌صورت تصادفی به ۴ گروه (در هر گروه ۷ سر موش صحرایی) شاهد، شاهد دیابتی، دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین و دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین تقسیم شدند. در گروه شاهد، موش‌های صحرایی به‌مدت ۲۵ روز به‌صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به‌عنوان حلال دارو دریافت کردند. موش‌های صحرایی گروه شاهد دیابتی پس از القاء دیابت تجربی توسط آلوکسان، به‌مدت ۲۵ روز به‌صورت داخل صفاقی ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سالین به-عنوان حلال دارو دریافت کردند. در گروه سوم، موش‌های صحرایی پس از القاء دیابت تجربی به مدت ۲۵ روز ۰/۵ میلی‌لیتر غلظت ۵۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی کروسین (Sigma-Aldrich, France) دریافت کردند و در نهایت موش های صحرایی گروه چهارم پس از القاء دیابت تجربی به مدت ۲۵ روز ۰/۵ میلی‌لیتر غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت داخل صفاقی کروسین دریافت کردند. لازم به ذکر است غلظت ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین به‌عنوان LD۵۰ در نظر گرفته شد. همچنین ED۵۰ کروسین در محدوده بین ۵۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده است. به همین دلیل غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان غلظت‌های درمانی انتخاب شد.

بمنظور ایجاد دیابت تجربی (دیابت وابسته به انسولین) در موش‌های صحرایی به دنبال ۱۶ ساعت ناشتایی، آلوکسان مونوهیدرات (Sigma-Aldrich, Germany) به میزان ۲۴۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن و یک نوبت بصورت داخل صفاقی تزریق شد. همچنین از بافر سیترات (pH=۵/۴) به عنوان حلال آلوکسان استفاده شد. تزریق آلوکسان به گروه شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین صورت گرفت. با توجه به این‌که مطالعه روی دیابت مزمن می‌باشد، حدود ۳۰ روز پس از تزریق آلوکسان جهت تأیید القاء دیابت تجربی از ورید دمی خون‌گیری صورت گرفت و قند خون توسط دستگاه گلوکومتر مدل (EasyGluco, Korea-IGM ۰۰۰۲A) اندازه‌گیری شد. همچنین قندخون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن و روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد (۱۷).

بمنظور همزمان سازی سیکل تولید مثلی در موش های صحرایی مورد آزمایش، موش‌های صحرایی ماده ۵۵۰ میکروگرم استرادیول والرات (داروسازی ابوریحان، ایران) و ۳ میلی‌گرم پروژسترون (داروسازی عبیدی، ایران) به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روغن زیتون حل شد و به‌صورت عضلانی تزریق شد (۱۸). پس از ۳۶ ساعت، 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 یك تا دو قطره از مایع فوق برداشته و اسمیر تهیه شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مدل (Olympus, CX۲۱FS۱ (Japan با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر بررسی گردید. سیکل استروس موش‌های ماده تقریبا بین ۴ تا ۶ روز زمان می‌برد و دارای مراحل پرواستروس، استروس، مت‌استروس و دی‌استروس می‌باشد و هر مرحله با نسبت خاص سلول‌های شاخی، اپی‌تلیالی با هسته، اپی‌تلیالی بدون هسته و لوکوسیت‌ها مشخص می‌شود. موش‌هایی که در مرحله استروس سیکل تولید مثلی قرار داشتند برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شدند. اسمیر واژن در این مرحله از سیکل دارای سلول‌های شاخی بیشتر در مقایسه با سلول‌های اپی-تلیال بوده و فاقد لوکوسیت می‌باشد (۱۸). لازم به ذکر

www.SID.ir

Archive of SID

است که توسط این روش از بین ۶۵ سر موش صحرایی ماده ۲۸ سر انتخاب شد.

در پایان دوره آزمایش، موش‌های صحرایی با دی‌اتیل اتر (Merck, Germany) بی‌هوش شدند. سپس پوست ناحیه قفسه سینه، جناغ و دنده‌ها برش داده شد و با کنار کشیدن جناغ و دنده‌ها از بطن چپ قلب خون‌گیری انجام شد. خون گرفته شده بدون ماده ضد انعقاد درون لوله آزمایش ریخته و به مدت ۱۲ دقیقه در انکوباتور مدل INB400 (Memmert, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از وقوع انعقاد، لوله‌ها در دستگاه سانتریفیوژ مدل EBA280 (Hettich, Germany) به‌مدت ۱۲ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس سرم خون توسط سمپلر جدا و به لوله آزمایش دیگری منتقل و در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۷). سطح سرمی هورمون‌های مورد بررسی توسط روش ELISA، دستگاه الایزاریدر مدل ۲۱۰۰ (Stat Fax, USA) و کیت‌های شرکت Finetest (Finetest, China) سنجش شد. LH (حساسیت ۰/۹۳۸> میلی واحد بین الملل بر میلی‌لیتر، محدوده ۱۰۰-۱/۵۶۳ میلی واحد بین الملل بر میلی‌لیتر)، FSH (حساسیت ۱/۴۰۶> میلی واحد بین الملل بر میلی‌لیتر، محدوده ۱۵۰-۲/۳۴۴ میلی واحد بین الملل بر میلی‌لیتر)، استروژن (حساسیت ۹/۳۷۵> پیکوگرم بر میلی‌لیتر، محدوده ۱۰۰۰-۱۵/۶ پیکوگرم بر میلی‌لیتر)، پروژسترون (حساسیت ۰/۹۳۸> نانوگرم بر میلی‌لیتر، محدوده ۱۰۰-۱/۵۶۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر). سنجش‌ها بر اساس روش موجود در دفترچه راهنمای شرکت سازنده کیت صورت گرفت. میزان ضریب تغییرات (CV٪) اینترا-اسی و اینترا-اسی برای هورمون FSH بترتیب ۴/۴۲-۳/۴۱ و ۳/۶-۲/۱، برای هورمون LH بترتیب ۵/۶۶-۱/۲ و ۴/۶-۳/۲، برای هورمون استروژن بترتیب ۹/۶۷- ۵/۵۴ و ۶/۳۲-۱/۲ و برای هورمون پروژسترون بترتیب ۵/۷۷-۲/۴ و ۵/۴-۳/۸ درصد بود.

اطلاعات به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش۲۰ تحلیل شد. با توجه به این‌که نتایج به‌دست آمده کمی است، توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov فرض طبیعی بودن توزیع فراوانی داده‌ها بررسی شد (p>۰/۰۵). جهت مقایسه میانگین بین گروه‌های مورد آزمایش از آزمون One-way ANOVA و جهت مقایسه زوج گروه‌ها از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. همچنین نتایج به‌دست آمده به‌همراه محاسبات آماری مربوطه به‌صورت خطای معیار میانگین±میانگین (Mean±SEM) گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

تحلیل داده های این آزمایش نشان داد سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن و پروژسترون در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد دیابتی بود (p<۰/۰۵). سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH استروژن و پروژسترون در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p<۰/۰۵). سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن و پروژسترون در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵). سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن و پروژسترون در گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین در مقایسه با گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵) که نشان دهنده اثر وابسته به دوز تزریقی کروسین است. (جدول ۱)

مطالعه حاضر به بررسی اثر کروسین بر سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن و پروژسترون در موش‌های صحرایی دیابتی پرداخت. نتایج پژوهش حاضر نشان داد تزریق آلوکسان مونوهیدرات به میزان ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی گروه شاهد دیابتی و گروه‌های دیابتی تحت تیمار با کروسین موجب القاء دیابت نوع یک می‌شود. همچنین گزارش شده است، آلوکسان مونوهیدرات به‌دلیل دارا بودن اثرات سایتوتوکسیک موجب تخریب سلول‌های بتا پانکراس و القاء دیابت نوع یک می‌شود (۱۹) از سوی دیگر تجویز آلوکسان موجب القاء

جدول ۱- مقایسه میانگین سطح سرمی هورن های محور هیپوفیز- تخمدان به تفکیک گروه

گروه/ متغیر	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	استروژن (pg/ml)	پروژسترون (ng/ml)
شاهد	۷/۲۵±۱/۲۵	۵/۶۵±۰/۶۲	۲۱/۷۳±۳/۱۸	۹/۵۵±۱/۶۰
شاهد دیابتی	^{a} ۲/۰۰±۰/۲۱	^{a} ۰/۹۳±۰/۱۸	^{a} ۶/۴۰±۰/۹۵	^{a} ۲/۴۵±۰/۵۵
دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروسین	^{b} ۳/۹۵±۰/۸۴	^{b} ۲/۸۶±۰/۶۸	^{b} ۱۱/۴۵±۱/۶۵	^{b} ۵/۲۶±۰/۹۵
دیابتی تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروسین	^{bc} ۵/۸۵±۰/۵۳	^{bc} ۴/۰۸±۰/۸۵	^{bc} ۱۵/۰۰±۲/۲۳	^{bc} ۶/۳۰±۱/۰۸
One-way ANOVA p-value	۰/۰۰۳	۰/۰۰۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۱

(n=۷)؛ داده‌ها به صورت" انحراف معیار± میانگین" می‌باشند؛a : p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد. b: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه شاهد دیابتی. c: p<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دیابتی تحت تیمار با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین.

www.SID.ir

Archive of SID

آپاپتوسیز در سلول‌های بتا پانکراس می‌شود. افزایش میزان رادیکال‌های آزاد درون سلولی ناشی از دیابت، موجب افزایش پتانسیل نفوذپذیری غشای میتوکندری‌ها و خروج سیتوکروم C می‌شود که این امر نقش تعیین کننده‌ای در راه‌اندازی مسیر آپوپتوسیز در سلول‌های بتا پانکراس دارد (۲۰) همسو با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر مشخص شد یک‌بار تزریق ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش‌های صحرایی موجب القاء دیابت نوع یک می‌شود (۱۷).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن و پروژسترون در موش‌های صحرایی گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. مشخص شده است دیابت منجر به ایجاد استرس‌اکسیداتیو در هیپوفیز می‌شود و به عنوان غده ترشح کننده گنادوترپین‌ها، می‌تواند بر فعالیت محور هیپوفیز- گناد، هورمون‌های جنسی و میزان باروری موثر باشد. میزان ترشح LH و FSH هم به سطح سرمی این دو هورمون و هم به تعداد گیرنده‌های آن‌ها بستگی دارد. دیابت و استرس اکسیداتیو ناشی از آن با افزایش سطح رادیکال‌های سلولی و با تأثیر برگیرنده‌های LH، FSH باعث کاهش سطح سرمی این هورمون‌ها می‌شوند (۲۱). یافته‌های پژوهشی حاکی از کاهش ترشح LH، FSH و اختلال در تخمک‌ریزی موش‌های صحرایی دیابتی است و درمان با انسولین موجب افزایش فعالیت محور هیپوفیز- تخمدان و افزایش تخمک ریزی می‌شود (۲۲). در پژوهشی دیگر عنوان شد هورمون انسولین تحریک کننده هیپوفیز جهت ترشح گنادوتروپین است و دیابت با کاهش ترشح انسولین موجب کاهش ترشح LH و FSH از هیپوفیز می‌شود و نتیجه این کاهش، اختلال در تخمک‌گذاری و اختلال در فعالیت محور هیپوفیز- تخمدان است (۸). پژوهشی به بررسی سطح سرمی هورمون‌های تستوسترون و LH در موش‌های صحرایی دیابتی پرداخت. نتایج نشان داد القاء دیابت تجربی موجب کاهش سطح سرمی هورمون‌های تستوسترون و LH می‌شود و گزارش شد دیابت به‌طور قابل توجهی موجب اختلال در سیستم تولیدمثلی می‌شود (۲۳). محققین ثابت کردند دیابت مزمن موجب کاهش ترشح LH و FSH از هیپوفیز قدامی می‌شود. از طرفی آزمایش‌های حیوانی نشان دهنده کاهش ترشح گنادوتروپین‌ها در نمونه‌های دیابتی است (۲۴).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد تجویز وابسته به دوز کروسین با غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به موش-های صحرایی دیابتی در مقایسه با نمونه‌های شاهد دیابتی موجب افزایش معنی‌داری در غلظت سرمی هورمون‌های LH، FSH، استروژن و پروژسترون شد. طی تحقیقات انجام شده عصاره زعفران دارای اثر محافظتی در مقابل ازدیاد قند و لیپید خون در موش‌های صحرایی دیابتی است و عنوان شد عصاره زعفران با کاهش سطح سرمی گلوکز و افزایش انسولین موجب کاهش عوارض دیابت در موش‌های صحرایی مدل دیابت تجربی نوع یک می‌شود. محققین این ثرات را به خواص آنتی‌اکسیدانی کروسین موجود در عصاره زعفران نسبت دادند (۲۵). طبق تحقیقات صورت گرفته به‌نظر می‌رسد یکی از مکانیسم‌های دخیل در اثرات هیپوگلیسمیک کروسین، کاهش مقاومت به انسولین است و با تحریک برداشت گلوکز از طریق بافت‌های محیطی و مهار جذب گلوکز روده‌ای موجب کاهش گلوکز خون می‌شود. از سوی دیگر مشخص شده است بخش مهمی از عملکرد هیپوگلیسمیک ترکیبات زعفران به‌واسطه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن باشد (۲۶). مطالعات نشان داد کروسین پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد و موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در فولیکول‌های تخمدان موش‌های آزمایشگاهی می‌شود (۲۷). در مطالعه‌ای مشخص شد کروسین دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است و از طریق جمع‌آوری و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند. همچنین گزارشاتی مبنی بر مهار تولید آنیون سوپراکسید و رادیکال هیدروکسیل توسط کروسین وجود دارد (۲۸). با توجه به اثرات آنتی‌اکسیدانی و هیپوگلیسمیک ترکیبات موجود در عصاره زعفران می‌توان گفت احتمالا افزایش غلظت هورمون‌های محور هیپوفیز- تخمدان پس تجویز کروسین به موش‌های صحرایی دیابتی می‌تواند ناشی از کاهش شرایط استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان باشد. طبق تحقیقات انجام شده کروسین دارای اثرات محافظت بافتی است و از آسیب به ساختار و عملکرد کلیه در طی هیپرگلیسمی مزمن جلوگیری می‌کند. همچنین کروسین از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی، کاهش رادیکال‌های آزاد و مهار فرایند استرس‌اکسیداتیو در بافت کلیه از بروز نفروپاتی دیابتی در طی هیپرگلیسمی مزمن جلوگیری نماید (۲۹).

پژوهشی به بررسی تاثیر عصاره زعفران بر سطح سرمی هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون در موش‌های سوری پرداخت و مشخص شد عصاره زعفران دارای ترکیباتی است که موجب افزایش سطح سرمی گنادوتروپین‌های هیپوفیز پیشین می‌شود و به دنبال آن سرمی تستوسترون نیز افزایش می‌یابد. همچنین گزارش شد افزایش هم‌زمان در سطح سرمی هورمون تستوسترون و هورمون‌های LH، FSH از هیپوفیز پیشین نشان دهنده تاثیر عصاره زعفران بر افزایش فعالیت محور هیپوفیز- بیضه است (۳۰). پژوهشی به بررسی اثرات محافظتی کروسین بر هیستومورفومتری بیضه و پارامترهای هورمونی در موش‌های سوری بالغ تحت تیمار با سیکلوفسفامید پرداخت. نتایج نشان داد کروسین با افزایش فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه و افزایش فعالیت محور هیپوفیز- بیضه موجب افزایش ترشح هورمون تستوسترون در موش-های سوری تحت تیمار با سیکلوفسفامید می‌شود (۳۱). مشخص شده است دیابت با افزایش التهاب در بافت تخمدان موجب کاهش فعالیت ترشحی هورمون‌های تخمدانی می‌شود (۸). تحقیقات نشان داد عصاره زعفران، کروسین و سافرانال می‌توانند موجب مهار روندهای التهابی شوند (۳۲). بنابراین می‌توان گفت احتمالا کروسین با کاهش التهاب سیستمیک ناشی از دیابت و کاهش التهاب بافت تخمدان موجب افزایش فعالیت محور هیپوفیز تخمدان شده است.

در پژوهش حاضر کروسین توانست موجب افزایش فعالیت محور هیپوفیز- تخمدان در موش‌های صحرایی دیابتی شود. افزایش فعالیت این محور با افزایش سطح سرمی گنادوتروپین‌ها همراه است و احتمالا در نهایت موجب افزایش تخمک‌ریزی در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود اثر کروسین بر سایر جنبه‌های اختلالات باروری در افراد دیابتی مورد بررسی قرار گیرد همچنین پیشنهاد می‌شود اثر کروسین بر سایر محورهای هورمونی مانند هیپوفیز- آدرنال، هیپوفیز- تیروئید و هیپوفیز- بیضه مورد بررسی قرار گیرد. لازم به ذکر است عدم بررسی بافت تخمدان به منظور مقایسه تعداد دستجات فولیکولی

www.SID.ir

Archive of SID

بین گروهای شاهد، شاهد دیابتی و گروه‌های تحت تیمار با کروسین از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه است. همچنین عدم بررسی‌های سلولی و مولکولی درمورد مکانیسم اثر کروسین بر افزایش فعالیت محور هیپوفیز- تخمدان از دیگر محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان گفت تجویز وابسته به دوز کروسین از طریق افزایش ترشح گنادوتروپین‌های هیپوفیز قدامی موجب تنظیم سطح سرمی استروژن و پروژسترون می‌شود. افزایش سطح سرمی هورمون‌های جنسی در موش‌های صحرایی دیابتی ماده احتمالا به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و نقش آن در افزایش فعالیت محور هیپوفیز- تخمدان می‌باشد. از این‌رو کروسین به‌عنوان یک فرآورده طبیعی، احتمالا می‌تواند موجب بهبود اختلالات هورمونی در بیماران دیابتی شود.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های دانشگاه پیام‌نور، تشکر و قدردانی می‌گردد. لازم به ذکر است این مقاله از طرح پژوهشی مصوب در جلسه شورای پژوهشی گروه دامپزشکی دانشگاه پیام‌نور استان خراسان رضوی به شماره ۱/۱۲/۲۱۸۱ استخراج شده است.

منابع مورد استفاده

1. Mays L. Diabetes Mellitus Standards of Care. *Nursing Clinics of North America* 2015; 50(4): 703-711.

2. Jin J, Yang W. Molecular regulation of hypothalamus–pituitary–gonads axis in males. *Gene* 2014; 551(1): 15-25.

3. Campbell I. Hypothalamic and pituitary function. Anaesthesia & Intensive Care Medicine 2016; 17(12): 652-654.

4. Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Palomo MJ, Rivera M, Rigau T, et al. Tungstate administration improves the sexual and reproductive function in female rats with streptozotocin-induced diabetes. *Human Reproduction* 2007; 22(8): 2128-2135.

5. Wellons MF, Matthews JJ, Kim C. Ovarian aging in women with diabetes: An overview. *Maturitas* 2017; 96: 109-113.

6. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress - A concise review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2016; 24(5): 547-553.

7. Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Archives of Oral Biology* 2006; 51(8): 640-648.

8. Nandi A, Poretsky L. Diabetes and the Female Reproductive System. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2013; 42(4): 915-946.

9. McCance D.R. Pregnancy and diabetes. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 2011; 25(6): 945-958.

10.Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA. Crocus sativus biological active constituents. *Studies in Natural Products Chemistry* 2002; 26(7): 293-312.

11. Vakili A, Eianali MR, Bandegi AR. The protective effects of Saffron against the oxidative damage in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. *Tehran University Medical Journal* 2011; 69(7): 405-412.

12. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Mostafavi M. Study of protective effects of crocin on testicular histomorphometryand serological parameters incyclophosphamide on treated adult mice. *Urmia Medical Journal* 2014; 25(7): 663-673.

13. Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227(1): 20-25.

14. Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacology and Toxicology* 2002; 2: 7-15.

15. Samadi H, Javadi S, Asri S. Evaluation of the effects of crocin on the serum levels of glucose, insulin, urea, creatinine and β2m in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Urmia Medical Journal* 2015; 26(9(: 802-812.

16. Yaribeygi H, Mohammadi M. Protective Effect of Crocin on Kidney Performance in Chronic Uncontrolled Hyperglycemia-Induced Nephropathy in Rat. *Zanjan University of Medical Sciences* 2017; 25(109): 36-49.

17. Sadoughi SD. The effect of curcumin on the hormones of pituitary-adrenal axis and renal indices in alloxan-induced diabetic rats. *Daneshvarmed* 2017; 24(126): 79-90.

18.Hosseini E, Hjeidari M. Effect of Valsartan on the hormones of Pituitary-gonadal axis Performance in mature female Wistar Rats. *Journal of Birjand University of Medical Sciences* 2013; 19(4): 409-415.

19. Santos GJ, Oliveira CAM, Boschero AC, Rezende LF. CNTF protects MIN6 cells against apoptosis induced by alloxan and IL-1β through downregulation of the AMPK pathway. *Cell Signal* 2011; 23(10): 1669-1676.

20. Oryan A, Hashemnia M, Hamidi A, Mohammadalipour A. Effects of hydro-ethanol extract of Citrullus colocynthis on blood glucose levels and pathology of organs in alloxan-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2014; 4(2): 125-130.

21. Tirabassi G, Chelli FM, Ciommi M, Lenzi A, Balercia G. Influence of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation on the metabolic profile of patients affected by diabetes mellitus-associated late onset hypogonadism. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2016; 26(1): 53-59.

www.SID.ir

Archive of SID

22. Liu FTY, Lin HS, Johnson DC. Serum FSH, LH and the Ovarian Response to Exogenous Gonadotropins in Alloxan Diabetic Immature Female Rats. *Endocrinology* 2009; 91(5): 1172-1179.
23. Ostovan F, Gol A, Olomi H. Effects of Citrullus Colocynthis pulp on serum testosterone and LH levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiology and Pharmacology* 2014; 18(3): 347-353.
24. Codner E, Eyzaguirre FC, Iñiguez G, López P, Pérez-Bravo F, Torrealba IM, et al. Ovulation rate in adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Fertility and Sterility* 2011; 95(1): 197-202.
25. Shirali S, Bathayi SZ, Nakhjavani M, Ashoori MR. Effects of saffron (Crocus Sativus L.) aqueous extract on serum biochemical factors in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2012; 28(2): 293-308.
26. Xi L, Qian Z, Xu G, Zheng S, Sun S, Wen N, et al. Beneficial impact of crocetin, a carotenoid from saffron on insulin sensitivity in fructose-fed rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2007; 18(1): 64-67.
27. Mokhber Maleki E, Eimani H, Bigdeli MR, Ebrahimi B, Shahverdi AH, Golkar Narenji A, et al. A comparative study of saffron aqueous extract and its active ingredient, crocin on the in vitro maturation, in vitro fertilization, and in vitro culture of mouse oocytes. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2014; 53(1): 21-25.
28. Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, Kourtzelis I, Fletouris D, Theodoridis A, et al. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology* 2015; 84(8): 1273-1282.
29. Yaribeygi H, Mohammadi M. Protective Effect of Crocin on Kidney Performance in Chronic Uncontrolled Hyperglycemia-Induced Nephropathy in Rat. *ZUMS Journal 2017*; 25(109): 36-49.
30. Modaresi M, Messripour M, Asadi Marghmaleki M, Hamadanian M. Effect of Saffron (Crocus sativus) Extract on Level of FSH, LH and Testosterone in Mice. *ZUMS Journal* 2008; 16(63):11-18.
31. Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Mostafavi M. Study of protective effects of crocin on testicular histomorphometryand serological parameters incyclophosphamide on treated adult mice. T*he Journal of Urmia University of Medical Sciences* 2014; 25(7): 663-373.
32. Tamaddonfard E, Farshid AA, Eghdami K, Samadi F, Erfanparast A. Comparison of the effects of crocin, safranal and diclofenac on local inflammation and inflammatory pain responses induced by carrageenan in rats. *Pharmacological Reports* 2013; 65(5): 1272-1280.

www.SID.ir