

## تأثیر توأم عصاره هیدروالکلی ریشه گزنه و متفورمین بر بافت تخمدان مدل دیابتی موش صحرایی نژاد ویستار

حدیثه اسفده، غدیره میرابوالقاسمی، مهناز آذرنیا

گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: مهناز آذرنیا، azarnia@khu.ac.ir

**چکیده.** دیابت ملیتوس با مقاومت انسولین، به عنوان اختلال عملکرد سلول‌های بتا و افزایش تولید گلوکز کبدی شناخته می‌شود. کنترل ضعیف گلوکز در زمان هیپرگلیسمی سبب ایجاد آسیب به بافت‌ها و ایجاد عواقب خطرناک مانند ناباروری می‌شود. هیپرگلیسمی مزمن اثرات مضر روی رشد فولیکول‌ها دارد که برای عملکرد طبیعی جنسی زنان ضروری است. متفورمین بیشترین داروی تجویزی در بیماری دیابت است. اما داروهای شیمیایی علی‌رغم فواید غیر قابل انکار، دارای اثرات مخرب نیز هستند. از این رو استراتژی‌های جایگزین برای داروهای فعلی دیابت ضروری است. داروهای گیاهی به طور وسیعی توسط بیماران، بنا بر توصیه‌های غیر پزشکی به عنوان مواد پایین آورنده قند خون استفاده می‌شوند که گیاه گزنه از جمله این گیاهان است. گزنه از طریق ترشح انسولین و افزایش تکثیر سلول‌های بتای پانکراس باعث کاهش سطوح گلوکز پلاسما می‌شود. هدف پژوهش حاضر تعیین اثر عصاره ریشه گزنه به عنوان مکمل متفورمین بر بافت تخمدان مدل دیابتی است. در این مطالعه، از ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با وزن تقریبی  $20 \pm 180$  گرم استفاده شد. حیوانات تحت آزمایش پس از توزین، بطور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. (۱) گروه کنترل، (۲) گروه دیابتی که با داروی آلوکسان ( $150 \text{ mg/kg}$ ) به صورت تزریق داخل صفاقی دیابتی شدند، (۳) گروه دیابتی + عصاره ریشه گزنه ( $150 \text{ mg/kg}$ )، (۴) گروه دیابتی + متفورمین ( $150 \text{ mg/kg}$ )، (۵) گروه دیابتی + متفورمین ( $150 \text{ mg/kg}$ ) + عصاره ریشه گزنه ( $150 \text{ mg/kg}$ ). در پایان دوره درمان، اثر متفورمین و عصاره ریشه گزنه بر روی وزن بدن، بافت تخمدان و فاکتورهای بیوشیمیایی از جمله قند خون و هورمون‌های جنسی تحت بررسی و مقایسه قرار گرفت. هم چنین داده‌های به دست آمده با استفاده از تحلیل‌های آماری مقایسه شد. هیپرگلیسمی و کاهش وزن بدن بعد از تجویز متفورمین و ریشه گزنه به مدت ۴ هفته بهبود پیدا کرد. تجویز هم زمان متفورمین و عصاره ریشه گزنه سبب افزایش معنی دار فولیکول‌های آغازین، اولیه، ثانویه، جسم زرد و کاهش فولیکول‌های آترتیک و افزایش معنی دار سطح هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون نسبت به استفاده متفورمین به تنهایی بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ریشه گزنه با دارا بودن ترکیبات آنتی اکسیدانی و دیگر خواص خود می‌تواند به عنوان مکمل متفورمین دارای عملکرد اصلاحی بر هیپرگلیسمی و بهبود اختلالات تخمدان باشد.

**واژه‌های کلیدی.** آلوکسان، اورتیکا، پزشکی جایگزین، هورمون، هیپرگلیسمی

## The joint effect of hydro-alcoholic extract of nettle root and metformin on ovarian tissue of diabetic model of Wistar rat

Hadiseh Esfadeh, Ghadire Mirabolghasemi, Mahnaz Azarnia

Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Correspondent author: Mahnaz Azarnia, azarnia@khu.ac.ir

**Abstract.** Diabetes mellitus is known to be resistant to insulin, to dysfunction of beta cells and to increase liver glucose production. Poor glucose control during hyperglycemia causes damage to the tissues and creates dangerous consequences, such as infertility. Chronic hyperglycemia has harmful effects on the growth of follicles, which is essential for normal female sexual function. Metformin is the most widely prescribed drug in diabetes, but chemical drugs, despite their undeniable benefits, have destructive effects, so alternative strategies for current modern diabetes medications are essential. Herbal medicines are widely used by patients, based on non-medical recommendations and as blood-glucose-lowering agents, including the nettle. Nettle contributes to lower plasma glucose levels by secreting insulin and increasing the proliferation of beta cells in the pancreas. Therefore, the aim of this study was to determine the effect of nettle extract

as a supplement of metformin on ovarian tissue of diabetic model. In this experimental study, 30 female Wistar rats were used. Animals were weighed and randomly divided into 5 groups (n=6). 1) control group 2) diabetic group who were diabetic with intravenous injection of alloxan (150 mg / kg) 3) diabetic group + Nettle root extract (150 mg / kg) 4) diabetic + metformin (150mg / kg) 5) Diabetic group + Metformin(150 mg / kg) + Nettle root extract(150 mg / kg). At the end of treatment, the effect of metformin and nettle root extract on ovarian tissue and biochemical factors such as blood glucose and sex hormones were compared and the data obtained were analyzed by SPSS. Hyperglycemia and body weight loss after metformin and nettle root increased for 4 weeks. Simultaneous administration of metformin and extracts of nettle root significantly increased the primordial, primary, secondary, and corpus luteum and reduced the atretic follicles and significantly increased FSH, LH and testosterone levels as compared with metformin alone. The results of this study showed that the root of nettle with its antioxidant compounds and other properties could be a complement to metformin with a corrective effect on hyperglycemia and the improvement of ovarian disorders.

**Keywords.** alloxan, alternative medicine, hormone, hyperglycemia, nettle

## مقدمه

دیابت ملیتوس با نارسایی انسولین یا اختلال نقص انسولین (Khidr et al., 2017)، اختلال عملکرد سلول های بتا و افزایش تولید گلوکز کبدی شناخته می شود (Coughlan et al., 2014). دیابت هم چنین می تواند بر عملکرد غدد جنسی تأثیر بگذارد. در زنان دیابتی هیپرگلیسمی کنترل نشده، کمبود انسولین و عوارض مزمن دیابت باعث کاهش ذخایر تخمدان می شود (Akman et al., 2015). متفورمین اساس درمان دیابت نوع ۲ و بیشترین دارو تجویزی در این بیماری است (Nathan et al., 2009). مزایای بالینی عمده متفورمین شامل کاهش تولید گلوکز کبدی و بهبود حساسیت به انسولین محیطی است (Song, 2016). متفورمین فعالیت آنتی هیپرگلیسمی خود را عمدتاً با مهار گلوکونئوز کبدی و افزایش فعالیت انسولین در اندام های خاصی نظیر عضله و چربی اعمال می کند (Cho et al., 2015). بسیاری از داروهای شیمیایی مورد استفاده در بیماری دیابت، علی رغم فواید غیر قابل انکار، دارای آثار مخرب متعدد نظیر افزایش ذخایر چربی، تحلیل رفتن بافت چربی در محل تزریق و بروز شوک هیپوگلیسمی بوده است (Hunt et al., 2000). بنابراین استراتژی های جایگزین برای داروهای مدرن فعلی دیابت ضروری است. داروهای گیاهی به طور وسیعی توسط بیماران، بنا بر سنت ها و توصیه های غیر پزشکی به عنوان مواد پایین آورنده قند خون استفاده می شوند. از جمله این داروها که مورد مصرف آن سابقه تاریخی طولانی دارد، گیاه گزنه است. گزنه با نام علمی *Urtica dioica* L. متعلق به تیره *Urticaceae* است. در این تیره بیش از ۶۰۰ گونه در ۴۵ سرده گزارش شده است. *Urtica* یکی از مهم ترین سرده ها و شامل ۳۰ گونه است (Mukundi et al., 2017) افزایش ترشح انسولین و افزایش تکثیر سلول های بتای پانکراس توسط گیاه گزنه، که باعث

کاهش سطوح گلوکز سرم می شود، احتمالاً به خصوصیات آنتی اکسیدانی این گیاه مربوط می شود (Golalipour et al., 2010). فلاونوئیدها از ترکیبات بسیار مهم و آنتی اکسیدانی ریشه گزنه هستند (Abrol et al., 2005). فلاونوئیدهای اصلی شامل کورستین، روتین و کامفرول هستند. فعال ترین فلاونوئید موجود در ریشه گزنه، کورستین است که خواص آنتی اکسیدانی قوی و ضد التهابی دارد (Nabrdalik & Grata., 2015). با توجه به اثر آنتی اکسیدانی گزنه، در تحقیق حاضر بر آن شدیم اثر ترکیبی عصاره ریشه گزنه، به عنوان یک داروی گیاهی مکمل، با داروی متفورمین، به عنوان داروی کاهنده قند خون، را بر میزان قند خون و فاکتورهای تولید مثلی تخمدان بررسی کنیم.

## مواد و روش ها

در این مطالعه، ۳۰ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با میانگین وزنی  $180 \pm 20$  گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تهران خریداری شدند. حیوانات تحت بررسی در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد نگهداری شدند. موش ها دسترسی کامل به آب و غذا داشتند و پس از یک هفته جهت سازش با محیط جدید، به طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی به شرح زیر تقسیم شدند: (۱) گروه کنترل: بدون دریافت دارو با رژیم غذایی معمولی؛ (۲) گروه دیابتی: این گروه با محلول تازه تهیه شده آلوکسان با دوز ۱۵۰ mg/kg (Unal et al., 2011) به صورت محلول در آب مقطر (۵ درصد) بعد از ۲۴ ساعت ناشتا (بدون دریافت غذا) به روش تزریق داخل صفاقی دیابتی شدند (Gupta et al., 2005)؛ (۳) گروه دیابتی دریافت کننده عصاره ریشه گزنه: این گروه همانند گروه ۲ دیابتی شدند و عصاره ریشه گزنه با دوز ۱۵۰ mg/kg (Kargar Jahromi &

بافت تخمدان نیز برای مطالعات بافت شناسی خارج و جهت تثبیت بافت در محلول بوئن قرار داده شد.

### تهیه مقاطع میکروسکوپی از بافت تخمدان

به منظور تهیه مقاطع میکروسکوپی، بعد از شست و شوی بافت تخمدان‌ها با سرم فیزیولوژی و تثبیت آنها مراحل مختلف پاساژ شامل آبگیری، شفاف سازی و آغشتگی با پارافین توسط دستگاه پاساژ بافت انجام گرفت. سپس نمونه‌ها قالب گیری شدند و با استفاده از میکروتوم برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد. برش‌های بافتی با استفاده از رنگ آمیزی هماتو-کسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شدند.

### تجزیه و تحلیل آماری

در بخش هورمون‌ها و تعداد فولیکول‌ها، داده‌های کمی با کمک نسخه ۲۴ نرم افزار SPSS با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و (Mean±SE, P<0/05) Tukey تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. هم چنین در بخش قند خون داده‌ها با نرم افزار instat تجزیه و تحلیل آماری شدند.

## نتایج

### سنجش قند خون

نتایج بررسی تأثیر متفورمین و عصاره ریشه گزنه به تنهایی و یا توأم با یکدیگر بر میزان قند خون گروه‌های دیابتی شده مورد آزمایش در دو بازه زمانی الف) اولیه، یا روز اول ایجاد مدل و ب) روز ۲۸، پس از ۲۸ روز درمان به صورت زیر بود: تزریق درون صفاقی عصاره ریشه گزنه با دوز ۱۵۰mg/kg به مدت ۲۸ روز قند خون را در سطح معنی دار ۰/۰۵ کاهش داد اما معنی داری آن نسبت به استفاده از متفورمین، و نیز ریشه گزنه + متفورمین کمتر بود. به دنبال ۲۸ روز تجویز متفورمین با دوز ۱۵۰mg/kg به روش گاواژ، میزان قند خون در سطح معنی دار ۰/۰۰۱ کاهش یافت. از سوی دیگر تجویز توأم ریشه گزنه و متفورمین هر یک به مقدار ۱۵۰mg/kg نیز میزان قند خون را در سطح معنی دار ۰/۰۰۱ کاهش داده بود. قند خون گروه اخیر نسبت به گروه درمان شده با متفورمین به میزان بیشتری کاهش پیدا کرده بود. بدین ترتیب نتایج نشان می‌دهند که تجویز توأم متفورمین با عصاره ریشه گزنه باعث کاهش بیشتر قند خون نسبت به تجویز متفورمین و یا عصاره ریشه گزنه هر یک به تنهایی می‌شود (شکل ۱).

Karimi Jashni, 2016) را به صورت تزریق داخل صفاقی با استفاده از سرنگ انسولین روزانه به مدت چهار هفته دریافت کردند؛ ۴ گروه دیابتی دریافت کننده متفورمین: این گروه هم مانند گروه ۲ و ۳ دیابتی شدند و متفورمین با دوز ۱۵۰mg/kg (Salemi et al., 2016) را به صورت محلول در آب مقطر به روش گاواژ با استفاده از سرنگ مخصوص روزانه به مدت چهار هفته دریافت کردند (Akiniola et al., 2012)؛ ۵ گروه دیابتی دریافت کننده عصاره ریشه گزنه و متفورمین: این گروه بعد از دیابتی شدن به مدت چهار هفته عصاره ریشه گزنه ۱۵۰ mg/kg و متفورمین ۱۵۰mg/kg را دریافت کردند.

### نحوه آماده سازی عصاره ریشه گزنه

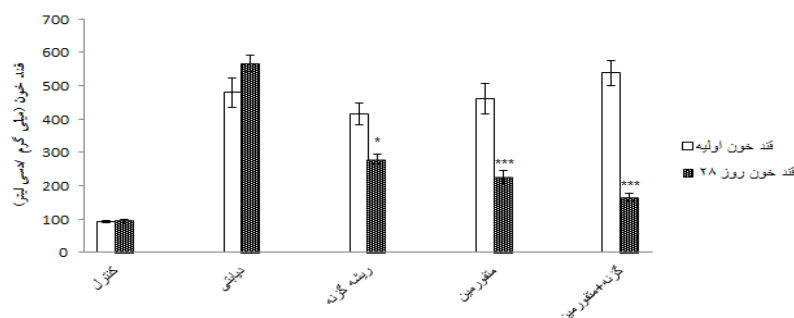
عصاره گیری به روش ماسراسیون یعنی خیساندن گیاه در حلال انجام گرفت، به این صورت که ریشه گزنه توسط آسیاب چندباره خرد شد و ۶۰ گرم از گیاه آسیاب شده به ظرف استوانه ای شیشه ای دارای خروجی منتقل شد. حلال استفاده شده اتانول ۸۰ درصد، و حجم مورد استفاده برای ۶۰ گرم گیاه ۱۰۰ میلی لیتر بود. در هر مرحله گیاه به همراه حلالی که حدوداً ۲ تا ۳ سانتی متر روی گیاه را پوشانده بود به مدت ۷۲ ساعت در ظرف در بسته باقی می ماند. عصاره جمع آوری شده توسط دستگاه تقطیر با خلاء تغلیظ شده، سپس عصاره تغلیظ شده به ظرف دیگری منتقل و تا زمان تبخیر کامل حلال در آن خلاء نگهداری شد. در نهایت عصاره تام تغلیظ شده با وزن نهایی ۲۳۷ گرم به دست آمد.

### بررسی صحت القای دیابت

در حیوانات بعد از گذشت یک هفته از تزریق آلوکسان، پر نوبی و پر ادراری مشاهده شد. همچنین سنجش قند خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر صورت گرفت. نمایان شدن قند خون بیش از ۲۴۰mg/dl به وسیله دستگاه، نشان دهنده القا دیابت در حیوانات تحت مطالعه بود (Gupta et al., 2005).

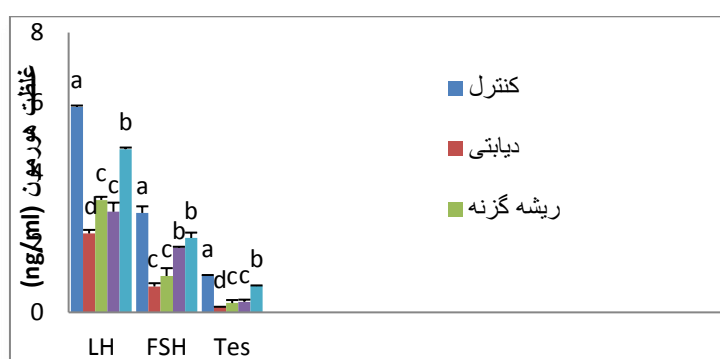
### نمونه برداری خونی و بافتی

در انتهای آزمایش، حیوانات به وسیله زایلازین و کتامین بیهوش شدند. بعد از اطمینان از بیهوش شدن حیوان، پوست ناحیه قفسه سینه رت‌های بیهوش باز شد و خون گیری از قلب انجام شد. سرم نمونه‌های خون به وسیله سانتریفیوژ، با سرعت ۱۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط، جدا شد. این سرم جهت سنجش هورمون‌های LH، FSH و تستوسترون مورد استفاده قرار گرفت.



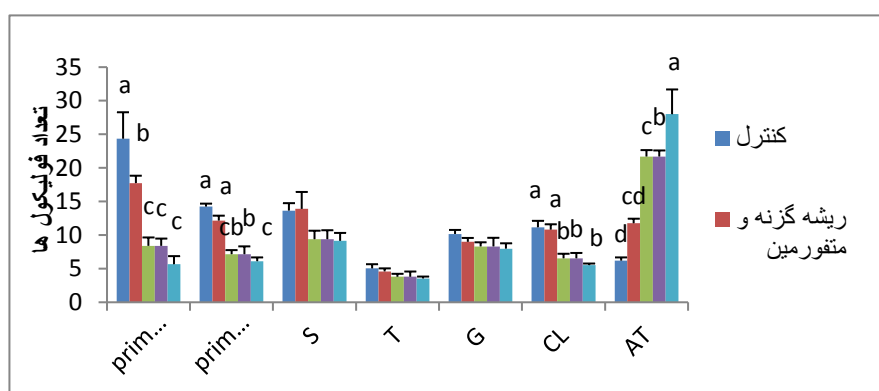
شکل ۱- مقایسه قند خون گروه های تجربی در دو بازه زمانی الف- روز اول (اولیه) ب- روز ۲۸. (N: 6, Mean±SE). \* اختلاف معنی دار در سطح  $P<0.05$  \*\*\* اختلاف معنی دار در سطح  $P<0.001$

**Fig. 1.** Comparison of blood glucose of the experimental groups in a: first day b: 28 day. (N: 6, Mean±SE). \* Significant difference in  $P<0.05$ ; \*\*\* Significant difference in  $P<0.001$



شکل ۲- مقایسه سطح سرمی هورمون های LH، FSH و تستوسترون در گروه های تجربی. (N: 6, Mean±SE). حروف متفاوت نشان دهنده معنی داری در سطح  $P<0.05$  است.

**Fig. 2.** Comparison of serum level of LH, FSH, and Testosterone hormones in the experimental groups. (N: 6, Mean±SE), Different letters indicate significant differences at  $P<0.05$ .



شکل ۳- مقایسه تعداد فولیکول های بدوی (Pmo)، اولیه (Pma)، ثانویه (S)، ثالث (T)، گراف (G)، آترتیک (A) و جسم زرد (CL) در گروه های تجربی. (N: 6, Mean±SE). حروف متفاوت نشان دهنده معنی داری در سطح  $P<0.05$  است.

**Fig. 3.** Comparison of the number of primordial (Pmo), primary (Pma), secondary (S), third (T), Graff (G), atresia (A) follicles and corpus luteum (CL) in the experimental groups. (N: 6, Mean±SE) Different letters indicate significant differences at  $P<0.05$ .

## سنجش هورمون

افزایش داشته است. در گروه های درمان شده با عصاره ریشه گزنه، متفورمین و گروه درمان شده با عصاره ریشه گزنه+ متفورمین تعداد فولیکول های آترتیک در سطح معنی دار ۰,۰۵ کاهش پیدا کرده بود. معنی داری در گروه عصاره ریشه گزنه+ متفورمین نسبت به گروه درمان شده با عصاره ریشه گزنه و گروه درمان شده با متفورمین بیشتر بود (شکل ۳). تعداد جسم زرد نیز در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش پیدا کرده بود، درحالی که در گروه های تحت درمان تعداد جسم زرد در مقایسه با گروه دیابتی افزایشی را نشان داد. افزایش تعداد جسم زرد در گروه دریافت کننده متفورمین+ ریشه گزنه معنی دار و در گروه های دریافت کننده متفورمین و ریشه گزنه به تنهایی معنی دار نبود (شکل ۳).

## بحث

در مطالعه حاضر تأثیر عصاره ریشه گزنه به عنوان مکمل داروی شیمیایی متفورمین در موش های صحرایی دیابتی القاء شده با آلوکسان تحت بررسی قرار گرفت. در این مطالعه تجویز آلوکسان به روش تزریق درون صفاقی باعث افزایش قند خون و القا دیابت شد. مطالعات انجام شده در موش های دیابتی از این فرضیه حمایت می کنند که ترکیبات آنتی اکسیدانی می توانند این پاتوژن را بهبود بخشند، که این ممکن است ناشی از اثرات مستقیم این ترکیبات روی ترشح انسولین، پیشگیری از مرگ سلول های بتا یا حتی از طریق تنظیم ازدیاد سلول های بتا باشد (Pinent et al., 2008). از اینرو این احتمال وجود دارد چنین ترکیباتی به تنهایی یا در ترکیب با سایر استراتژی های درمانی، داروهای مؤثرتری در مقابل شایعترین بیماری های دژنراتیو همانند دیابت باشند.

نتایج مطالعه اثر عصاره برگ گزنه، گلیمی پیرید، متفورمین و ترکیبات آنها نشان داده است که عصاره برگ گزنه، گلیمی پیرید، متفورمین و ترکیبات آنها، در رابطه با گروه دیابت، اثر کاهشی معنی داری در میزان قند خون داشته اند. اثرات مشاهده شده در گروه های توام عصاره برگ گزنه با گلیمی پیرید و متفورمین بیش از هر یک از داروها به تنهایی بود (Mamta & Preeti, 2013). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می دهد در گروه متفورمین+ عصاره ریشه گزنه نسبت به گروه هایی که عصاره ریشه گزنه و متفورمین را به تنهایی دریافت کرده بودند، میزان قند خون کاهش بیشتری داشته است. از این رو ریشه گزنه می تواند همانند برگ های این گیاه به

در مطالعه حاضر هورمون های LH, FSH و تستوسترون سرم خون مورد سنجش قرار گرفت. داده ها نشان داد که غلظت سرمی هورمون LH در رت های دیابتی کاهش معنی داری نسبت به رت های گروه کنترل داشته است. غلظت این هورمون در گروه های دریافت کننده متفورمین+ ریشه گزنه، متفورمین و ریشه گزنه در مقایسه با گروه دیابتی در سطح معنی دار  $P < 0.05$  افزایش داشت (شکل ۲). غلظت سرمی هورمون FSH نیز در رت های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنی دار  $P < 0.05$  کاهش داشت. افزایش غلظت این هورمون در گروه های دریافت کننده متفورمین+ عصاره ریشه گزنه، و متفورمین نسبت به گروه دیابتی معنی دار بود اما در گروه دریافت کننده عصاره ریشه گزنه نسبت به گروه دیابتی معنی دار نبود (شکل ۲). هم چنین نتایج بدست آمده معلوم ساخت غلظت سرمی هورمون تستوسترون در رت های دیابتی نسبت به گروه کنترل در سطح معنی دار  $P < 0.05$  کاهش داشته است، اما غلظت این هورمون در گروه های تحت درمان نسبت به گروه دیابتی در سطح معنی دار  $P < 0.05$  افزایش نشان داد (شکل ۲).

## مقایسه تعداد فولیکول های تخمدان

مقایسه تعداد فولیکول ها در گروه های مختلف آزمایشی نتایج زیر را معلوم ساخت. تعداد فولیکول های بدوی در گروه دیابتی بدون درمان در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری داشت. از سوی دیگر، تعداد این فولیکول ها در گروه های تحت درمان در مقایسه با گروه دیابتی افزایش یافته بود. در گروه درمان شده با عصاره ریشه گزنه و گروه درمان شده با متفورمین این افزایش معنی دار نبود، اما در گروه درمان شده با عصاره ریشه گزنه+ متفورمین تعداد فولیکول های بدوی در مقایسه با گروه دیابتی در سطح معنی دار ۰,۰۵ افزایش نشان داد (شکل ۳). تعداد فولیکول های اولیه نیز در گروه دیابتی بدون درمان در مقایسه با گروه کنترل در سطح معنی دار ۰,۰۵ کاهش یافته بود. در گروه درمان شده با عصاره ریشه گزنه افزایش مشاهده شده معنی دار نبود اما در گروه درمان شده با متفورمین و عصاره ریشه گزنه+ متفورمین تعداد فولیکول های اولیه در مقایسه با گروه دیابتی درمان نشده در سطح معنی دار ۰,۰۵ افزایش نشان داد که معنی داری گروه درمان شده با عصاره ریشه گزنه+ متفورمین از گروه درمان شده با متفورمین بیشتر بود (شکل ۳). نتایج هم چنین نشان داد که تعداد فولیکول های آترتیک در گروه دیابتی بدون درمان در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری

عنوان مکمل متفورمین خاصیت کاهش دهنده میزان قند خون را داشته باشد.

چنین نتیجه گیری می تواند به واسطه خاصیت آنتی اکسیدانی متفورمین به عنوان داروی کاهنده قند خون و از سوی دیگر خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره ریشه گزنه با دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی تفسیر شود. فلاونوئیدها جذب گلوکز را با مهار کردن  $\alpha$ -آمیلاز روده و  $\alpha$ -گلوکوزیداز مهار می کنند (Ota & Ulrih, 2017). علاوه بر این، متفورمین از طریق چندین مکانیسم موجب کاهش سطح گلوکز خون می شود. این مکانیسم ها عبارتند از: کاهش جذب گلوکز، افزایش حساسیت به انسولین در کبد و عضله با مهار گلوکونئوز در کبد، و افزایش جذب و استفاده از گلوکز در سلول های عضلانی. متفورمین AMPK (آنزیم کلیدی تنظیم گلوکز و انرژی) را تحریک و AMPK جذب سلولی گلوکز، اکسیداسیون اسید های چرب و تنظیم انتقال دهنده گلوکز 4 (GLUT4)، که فرآیند های متابولیک مهم در جذب انرژی هستند، را افزایش می دهد (Craeto et al., 2014).

مطالعه هیستومتری انجام شده بر روی بافت تخمدان نشان داد که هیپرگلیسمی بعد از ۲۸ روز باعث کاهش تعداد فولیکول های اولیه، بدوی و جسم زرد و افزایش تعداد فولیکول های آنترتیک شده است. از سوی دیگر، درمان با متفورمین و عصاره ریشه گزنه، موجب افزایش تعداد فولیکول های در حال رشد و کاهش تعداد فولیکول های آنترتیک در گروه های تحت درمان شده بود. تعداد فولیکول های بدوی در گروه دریافت کننده متفورمین + عصاره ریشه گزنه افزایش معنی داری را نشان داد. حال آن که در گروه متفورمین و گروه عصاره ریشه گزنه این افزایش معنی دار نبود. فولیکول های اولیه نیز در گروه های دریافت کننده عصاره ریشه گزنه + متفورمین، گروه دریافت کننده متفورمین، و گروه دریافت کننده عصاره ریشه گزنه به طور معنی داری افزایش پیدا کرده بود. هم چنین افزایش جسم زرد در گروه دریافت کننده متفورمین + عصاره ریشه گزنه معنی دار بود، این افزایش در گروه دریافت کننده متفورمین و گروه دریافت کننده عصاره ریشه گزنه معنی دار نبود.

اعتقاد بر این است که استرس اکسیداتیو عامل اصلی و اساسی اثر سوء دیابت بر عملکرد تخمدان هاست که می تواند آغاز کننده یا تسریع کننده آپوپتوز در سلول های تخمدان باشد (et al., 2016). کاهش استرس اکسیداتیو با تجویز آنتی اکسیدان ها می

تواند سبب کاهش اثرات بالقوه مخرب رادیکال های آزاد اکسیژن و در نتیجه افزایش تعداد و کیفیت اووسیت ها و فولیکول ها و هم چنین مهار آپوپتوز فولیکول های تخمدان در این افراد شود (Liu et al., 2008, Ruder et al., 2012). فلاونوئیدها که از جمله ترکیبات آنتی اکسیدانی ریشه گزنه هستند (Abrol et al., 2005)، با تشکیل پیوندهای غیر کووالانت در لایه های چربی نزدیک به غشای پلاسمایی سلول، فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش می دهند. فلاونوئیدها ممکن است با سر قطبی فسفولیپید ها در غشا ارتباط برقرار کنند و باعث افزایش ثبات غشا و در نتیجه محافظت از غشاء از آسیب اکسیداتیو شوند (Alanbaki et al., 2017).

مطالعه بر روی اثر عصاره هیدروالکلی ریشه گزنه بر فولیکولوزن و هورمون های استروژن و پروژسترون نشان داد که عصاره ریشه گزنه، وزن تخمدان و تعداد فولیکول های تخمدان (اولیه، ثانویه، ثالثیه) را افزایش می دهد که اثرات مثبت این گیاه را در بهبود عملکرد تخمدان نشان می دهد (Kargar Jahromi et al., 2016). عصاره ریشه گزنه، با افزایش میزان خون رسانی به تخمدان ها و در نتیجه افزایش انتشار اکسیژن در سلول های گرانولوزا، آترزی در فولیکول های اولیه و ثانویه را کاهش می دهد (Abdi et al., 2013). ویتامین C یکی دیگر از اجزای عصاره ریشه گزنه است که بر فولیکولوزن اثر می گذارد. محققان معتقدند که ویتامین C یک ماده کنترل کننده باروری در زنان است. آنها اهمیت اسید آسکوربیک را در پرو سه تولید مثل تأیید کردند (Saffari et al., 2015). ویتامین C یکی از فعال ترین آنتی اکسیدان ها محسوب می شود که باعث خنثی سازی رادیکال های آزاد می شود (Wolska et al., 2016). اثر ویتامین C بر استرس اکسیداتیو القایی در تخمدان موش صحرایی بررسی شده و مشخص شده است که ویتامین C باعث افزایش فولیکول های در حال رشد و فولیکول های بالغ می شود (Alkatib et al., 2012).

فاکتور دیگری که در این مطالعه مورد توجه قرار گرفت تغییرات هورمون های LH، FSH و تستوسترون بود. انسولین مهمترین تنظیم کننده محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد است. انسولین می تواند تقریباً به عنوان یک همگنادوتروپین با اتصال به گیرنده های سلولی بر روی سطح تکا، گرانولوزا و استرومای تخمدان عمل کند. انسولین سنتز هورمون در سلول های گرانولوزا و توسعه فولیکولار را تحریک می کند (Akman et al., 2015). دیابت منجر به

Azarneoshan *et al.*, ) افزایش سطح تستوسترون می‌شوند (, 2009). نتایج مطالعه نشان می‌دهد که کورستین باعث افزایش قابل توجهی در میزان تستوسترون و LH و FSH می‌شود ( Alanbaki *et al.*, 2017). اثر افزایشی کورستین بر روی تستوسترون نیز تأیید شده است (Ma *et al.*, 2004).

### نتیجه‌گیری

استفاده از عصاره ریشه گزنه با دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فلاونوئیدی، به عنوان مکمل متفورمین می‌تواند نقش مهمی در بهبود عوارض دیابت از جمله کاهش قند خون، بهبود شاخص‌های هورمونی، و فولیکول‌زایی داشته باشد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه خوارزمی جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

### REFERENCES

- Abdi, SH., Salehnia, M. and Hosseinkhani, S. 2013. Comparison of survival and developmental rates of mouse ovarian follicles after two and three dimensional cultures. – J. Modares Med. Sci. 16: 51-63.
- Abrol, S.O., Trehan, A. and Katore, O.P. 2005. Comparative study of different silymarin formulations: formulation and in vitro/in vivo evaluation. – Curr. Drug Deliv. 2: 45-51.
- Akiniola, O., Gabriel, M., Suleiman, A.A. and Olorunsogbon, F. 2012. Treatment of alloxan induced diabetic rats with metformin or glitazones is associated with amelioration of hyperglycaemia and neuroprotection. – Open Diabet. J. 5: 8-12.
- Akman, L., Erbas, O., Akdemir, A., Yavasoglu, A., Taskiran, D. and Kazandi, M. 2015. Levetiracetam ameliorates ovarian function in streptozotocin induced diabetic rats. – Gynecol. Endocrinol. 31: 657-662.
- Alanbaki, A.A., Mayali, H.M. and Mayali, H.K. 2017. The protective effect of quercetin and hesperidin on etoposide induced toxicity in male rats testicular. – JPSR 9: 1394-1405.
- Alkatib, S.R., AlAzam, A.H.A. and Habeab, S.A. 2012. The effect of vitamin C on ovary of female white rats treated with kmno4. Histological and physiological study. – Kufa J. Vet. Med. Sci. 3: 1-16.
- Azarneoshan, F., KhatamsazSaz, S. and Sadeghi, H. 2009. The effects of hydro alcoholic extract of doremaaucheri on blood concentration of gonadotropin and androgen hormones in adult rats. – Armaghane Danesh 14: 65-70.
- Cho, K., Chung, J.Y., Cho, S.K., Shin, H.W., Jang, I.J., Park, J.W., Yu, K.S. and Cho, J.Y. 2015. Anti-hyperglycemic mechanism of metformin occurs via the

ایجاد استرس اکسیداتیو سلولی در هیپوفیز به عنوان غده ترشح کننده گنادوتروپین ها می شود که می تواند بر میزان هورمون های FSH و LH و باروری تأثیر بگذارد. میزان ترشح سطح سرمی این دو هورمون هم چنین به تعداد گیرنده های آنها نیز بستگی دارد. دیابت و استرس اکسیداتیو ناشی از آن با افزایش سطح رادیکال های آزاد و با تأثیر بر گیرنده های FSH و LH باعث کاهش سطح سرمی این هورمون ها می شود (Tirabassi *et al.*, 2016). در طول دیابت، کاهش سطح تستوسترون ممکن است به علت تغییرات در ترکیب بدن، پلی مورفسم گیرنده های آندروژن، انتقال گلوکز و کاهش سطح آنتی اکسیدان ها باشد. در واقع ارتباط مستقیمی بین انسولین، تستوسترون و گنادوتروپین گزارش شده است. کاهش انسولین ترشح گنادوتروپین ها، هورمون های FSH و LH را مهار می کند. این دو هورمون باعث تولید آندروژن ها از جمله تستوسترون می شوند. بنابراین، سطح پایین گنادوتروپین ها تولید تستوسترون را کاهش می دهد (Dkhal *et al.*, 2016).

متفورمین باعث بهبود حساسیت به انسولین ( Woods *et al.*, 2009) افزایش سطح انسولین (Mosallanejad *et al.*, 2013) و محافظت از پانکراس در مقابل تخریب سلول بتا ( Vukovic *et al.*, 2007) می شود. از سوی دیگر همان طور که گفته شد، گزنه دارای فلاونوئیدهای اصلی کورستین، روتین و کامفرول است (Nabrdalik & Grata, 2015). کورستین می تواند سطح گلوکز خون موش های دیابتی را به میزان نرمال کاهش دهد که این امر مربوط به توانایی آن برای بازسازی سلول های بتای پانکراس و افزایش انسولین آزاد است. کامفرول نیز به عنوان مهار کننده  $\alpha$ -گلوکوزیداز، بهبود مقاومت به انسولین و هوموستاز گلوکز عمل می کند. روتین در فعالیتی مشابه با کورستین باعث جذب کلسیم در پانکراس از طریق کانال  $Ca^{+2}$  وابسته به ولتاژ می شود که ممکن است بهبود تولید ATP در سلول های بتای پانکراس و افزایش فعال سازی رونویسی انسولین به وسیله سیگنالینگ (cAMP) را فراهم کند (Soares *et al.*, 2017). هم چنین تحقیق روی اثرات فلاونوئیدها بر میزان هورمون LH نشان می دهد که فلاونوئیدها باعث افزایش میزان هورمون LH در هیپوفیز قدامی در موش های صحرایی ماده در معرض استرس می گردند ( Wang *et al.*, 1994). به علاوه فلاونوئیدها آنزیم  $\alpha$  لفا ردوکتاز را مهار کرده که تستوسترون را به دی هیدروتستوسترون تبدیل می کند. و باعث

- AMPK/LXR $\alpha$ /POMC pathway. – Sci. Rep. 5: 8145.
- Coughlan, K., Valentine, R., Ruderman, N. and Saha, A.** 2014. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? – Diabet. Metab. Syndr. Obes. 7: 241-253.
- Crasto, W., Rao, P. and Gleeson, H.** 2014. The effect of metformin on reproduction—A short review. – J. Endocrinol. Diabet. Obes. 2: 1-7.
- Dkhil, M.A., Zrieq, R., Al-Quraishy, S. and Abdel Moneim, A.E.** 2016. Selenium nanoparticles attenuate oxidative stress and testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats. – Molecules 21: 2-13.
- Golalipour, M.J., Ghafari, S., Kouri, V. and Kestkar, A.A.** 2010. Proliferation of the  $\beta$ -cell pancreas in diabetic rats treated with *urtica dioica*. – Int. J. Morphol. 28: 399-404.
- Gupta, R.K., Kesari, A.N., Murthy, P.S., Chandra, R., Tandon, V. and Watal, G.** 2005. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. – J. Ethnopharma. 99: 75-81.
- Hunt, L.M., Arar, N.H. and Akana, L.L.** 2000. Herbs, prayer, and insulin: use of medical and alternative treatments by a group of Mexican-American diabetic patients. – J. Fam. Pract. 49: 216-223.
- Kargar Jahromi, H. and Karimi Jashni, H.** 2016. Effect of nettle root extract on folliculogenesis and estrogen and progesterone hormones in rats. – IJBR 7: 533-538.
- Khidr, B.M., El-Sokkary, G.H. and Saleh, S.M.** 2017. Study on morphological changes induced by aspartame on liver of normal and diabetic male albino rats. – Histol. Histopathol. 4: 1-8.
- Liu, J., Liu, M., Ye, X., Liu, K., Huang, J., Wang, L., Ji, G., Liu, N., Tang, X., Baltz, J.M., Keefe, D.L. and Liu, L.** 2012. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC). – Hum. Reprod. 27: 1411-1420.
- Ma, Z., Nguyen, T.H., Huynh, T.H., Do, P.T. and Huynh, H.** 2004. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin–finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. – J. Endocrinol. 181: 493-507.
- Mamta, S. and Preeti, K.** 2013. Interacting effect of co-administration of *Urtica dioica* leaf extract with two oral antidiabetic agents (glimepiride and metformin) in streptozotocin and DNA induced diabetic rats. – IJUPBS 2: 326-335.
- Mosallanejad, B., Avizeh, R., Najafzadeh Varzi, H. and Pourmahdi, M.** 2013. A comparison between metformin and garlic on alloxan-induced diabetic dogs. – Comp. Clin. Path. 22: 169-174.
- Mukundi, M.J., Mwaniki, N.E.N., Piero, N.M., Murugi, N.J. and Kelvin, J.K.** 2017. Potential anti-diabetic effects and safety of aqueous extracts of *urtica dioica* collected from narok county, Kenya. – Pharm. Anal. Acta 8: 2-8.
- Nabrdalik, M. and Grata, K.** 2015. Assessment of antifungal activity of extracts from nettle (*Urtica dioica* L.) against *Alternaria solani*. – PECO 9: 474-481.
- Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R. and Sherwin, R.** 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. – Diabet. Care. 32: 193-203.
- Nayki, U., Onk, D., Balci, G., Nayki, C., Onk, A. and Gunay, M.** 2016. The effects of diabetes mellitus on ovarian injury and reserve: an Experimental study. – Gynecol. Obstet. Invest. 81: 424-429.
- Ota, A. and Ulrih, N.P.** 2017. An overview of herbal products and secondary metabolites used for management of type two diabetes. – Front Pharmacol. 6: 1-14.
- Pinent, M., Castell, A., Baiges, I., Montagut, G., Arola, L. and Ardevol, A.** 2008. Bioactivity of flavonoids on insulin-secreting cells. – Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 7: 299-308.
- Ruder, E.H., Hartman, T.J., Blumberg, J. and Goldman, M.** 2008. Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. – Hum. Reprod. Update 14: 345-357.
- Saffari, S., Bahadori, M.H., Sharami, S.H., Torabzadeh, P. and Goudarzvand, M.** 2015. The relationship between level of vitamin C in follicular fluid and maturation of oocytes and embryo quality in patients undergoing invitro fertilization. – JBUMS 17: 22-27.
- Salemi, Z., Rafie, E., Taghi Goodarzi, M. and Ghaffari, M.** 2016. Effect of metformin, acarbose and their combination on the serum visfatin level in nicotinamide/ streptozocin-induced type 2 diabetic rats. – Iran. Red Crescent Med. J. 18: e23814.
- Soares, J.M.D., Pereira Leal, A.E.B., Silva, J.C., Almeida, J.R.G.S. and de Oliveira, H.P.** 2017. Influence of flavonoids on mechanism of modulation of insulin secretion. – Pharmacog. Mag. 13: 639-646.
- Song, R.** 2016. Mechanism of metformin: A Tale of Two Sites. – Diabet. Care. 39: 187-189.
- Tirabassi, G., Chelli, F.M., Ciommi, M., Lenzi, A. and Balercia, G.** 2016. Influence of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation on the metabolic profile of patients affected by diabetes mellitus associated late onset hypogonadism. – Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 26: 53-59.
- Unal, D., Aksak, S., Halici, Z., Sengul, O., Polat, B. and Unal, B.** 2011. Effects of diabetes mellitus on the rat liver during the postmenopausal period. – J. Mol. Histol. 42: 273-287.
- Vukovic, M., Lapcevic, M., Kalezic, N. and Gvozdenovic, B.S.** 2007. The effect of metformin on fasting and postprandial insulin secretion in obese patients with diabetes mellitus type 2. – Srp. Arh. Celok. Lek. 135: 447-52.
- Wang, C., Makela, T. and Adlercreutz, H.** 1994. Lignans flavonoids inhibit aromatase in human preadipocytes. – J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 50: 205-212.
- Wolska, J., Czop, M., Jakubczyk, K. and Janda, K.** 2016. Influence of temperature and brewing time of nettle (*Urtica dioica* L.) infusions on vitamin C content. – Rocz. Panstw. Zakl. Hig. 67: 367-371.
- Woods, Y.L., Petrie, J.R. and Sutherland, C.** 2009. Dissecting insulin signaling pathways: Individualized therapeutic targets for diagnosis and treatment of insulin resistant states. – Endocr. Metab. Immun. Disord. Drug Targets 9: 187-198.

\*\*\*\*\*

**How to cite this article:**

**Esfadeh, H., Mirabolghasemi, G. and Azarnia, M.** 2019. The joint effect of hydroalcoholic extract of nettle root and metformin on ovarian tissue of diabetic model of Wistar rat. – Nova Biol. Reperta 6: 131-139

اسفده، ح.، میرابوالقاسمی، غ. و آذرنیا، م. ۱۳۹۸. تأثیر توأم عصاره هیدروالکلی ریشه گزنه و متفورمین بر بافت تخمدان مدل دیابتی موش صحرایی نژاد ویستار: ۱۳۹-۱۳۱.