Effect 0f Insulin 0n conception of females of mouse and treatment of difficency by aged garlic extract

تأثير الانسولين على خصوبة اناث الفئران وعلاج نقصه باستخدام مستخلص الثوم المعمر AGE

د.أفتخارمهدي كاظم /مدرس
الكلية التقنية/المسيب /قسم تقنيات الأنتاج الحيواني

الخلاصة:-

اجريت الدراسة على (30)من اناث الفئران البيضاء البالغه ثم قسمت الى ثلاث مجاميع ،الاولى(G1) استحدث فيها مرض السكري بحقنها بمادة الالوكسان بجرعة 150mg/kg/ml . المجموعة الثانية (G2)اصيبت بمرض السكري وعولجت بمستخلص الثوم المعمر بجرعة 5ml/kg من وزن الجسم ولمدة (28) يوم المجموعة الثالثة (G) تركت للسيطرة . ثم اجريت الفحوصات قبل وبعد الحقن لقياس الهرمونات التكاثرية (FSH ، LH ،استروجين ، بروجسستيرون و الانسولين) كذلك تم قياس مؤشرات التكاثر (مؤشرات الخصوبة والحمل وعيوشية ما بعد الولادة وعيوشية الجراء الفطيمه) .أظهرت النتأئج ارتفاع معنوي في مستوى الهرمونات وموشرات التكاثر بعد العلاج بـ AgE وهذا يدل على تاثير نقص الانسولين على خصوبة الحيوان بتأثيره على محاور(تحت المهاد-النخاميه-المبيض) والغاء هذا التاثير باستعمال مستخلص الثوم المعمر (AGE)

ABSTRACT :-

The study was perFormed on 30 white adult females of mouse. then they were divided into 3 groups , the first 10 females were submitted to experimeutaly induced of diabetes mellitus by injection with (150mg/kg of .B.W per 1 ml) of Aloxan . the second group expermently incluced by diabotes milletus and treated with Aged Garlic extract (AGE) in dose of 5ml/kg of B.W for 28 days . The the third is left for conterol . The tests were performed before and after injection and treatment . fertility index were estimated to consist of gonadal hormones (FSH , LH , Estrogen and Progesteron) and the metabolic hormone insulin . then the fertility index (fertility , index ,Reproductive index , Gestationinde ,post natal viability index , weaning viability) The study demostrated significant increasing in leveles hormones and fertility indexes . this result explane the role of insulin lower effect on animale fertility by affection on Hypthalmous - pitutary - ovary axise and the using of AgE was effectv in treatment and prevante the nagative effect of inslin difficency .

المقدمه

الانسولين هو هرمون ببتيدي بنكرياسي ذو وزن جزيئي (5900 mo/wt) يتالف من (115) حامض اميني يفرز من خلاياcells Beta- الموجوده في جزر لانكرهانس وهو يلعب دور رئيسي بتنظيم ايض كل من الكربوهيدرات والدهون والبروتين لذا فأن الاعضاء التقليديه الهدف للانسولين هي العضلات والانسجه الدهنيه والكبد واستمرت هذه الاعضاء لتكون الهدف طيلة العقود الماضيه ولم يكن معروفاًان للانسولين دور مميز في تنظيم وظيفة المبايض والهرمونات القنديه gonadotropic وعلاقته بأصابة الحيوانات بمرض السكري أوتكيس المبايض المتعدد واضطراب التوازن الطاقي السلبي (Negativ energy balance) الحاصلة بعد ولادة الحيوانات. ان نظرية ارتفاع مستوى الانسولين التي ترتبط مع زيادة الاندروجين في المرضى الذين يعانون من مقاومة الانسولين ادت الى استعمال قابلية الانسولين على تحفيز عملية تكوين الستيروبيدات في خلايا المبيض خارج الجسم وأستعمال مستقبلات الانسولين على خلايا السدى المبيضيه Stromal cell والخلايا الجريبيه في المبيض لمعرفة تأثير الانسولين [1]

وقد توسعت الدراسات لمعرفة انتاج المبايض وتاثير مايسمى بعامل النمو الشبيه بالانسولين من نوع IGF-I وIGF-II وكذلك اكتشاف البروتينات المتحده مع عوامل النمو IGFBps وتاثيرها على وظائف المبيض الخلويه السريريه والمرضيه [1] .ولاهمية الموضوع في الانتاج الحيواني وضعت هذه الدراسه للجهاز التنظيمي للانسولين على المبايض .وحيث أن تنظيم المبايض من قبل النخاميه التي تفرز LH وFSH هو الاهم في تنظيم وظيفة المبايض فان ارتباط النخاميه بالانسولين يشارك في تطور الجريبات الطبيعي وتغيير مستواه ربما يؤدي الى قصور في وظيفة المبايض في الاضطرابات الحاصله في حالات الاصابه با لسكري وتكيس المبايض وحالات مقاومة الانسولين extreme insulin resistance .المظاهر الفسلجيه والسريريه لهذا الجهاز التنظيمي الذي يستخدم العوامل الدوائيه اصبحت واسعة الانتشار ولها تاثير اقتصادي كبير على الثروه الحيوانيه. كما ان العوامل الدوائيه لم تعد تفي بالغرض في علاج حالات العقم المتسببه عن نقص الانسولين لذا وضعت هذه الدراسه لاستعمال العوامل الدوائيه الطبيعيه

والاعشاب للقضاء على تاثيرات نقصانة الانسولين على وظيفة المبيض وتعديل مستوياته في الدم للوصول الى الحالة التكاثريه الجيده[2].أن مستخلصات الثوم اخذت حيزاًكبيرا في التطبيقات العلميه التي تخص تطوير الانتاج الحيواني.ثم درست طرق تحظيرها لتتنافس في اغناء بعضها بمواد جديدة تخص طريقة التحظير [2] .حيث ان تعتيق الثوم يؤدي الى تكوين جزيئات غير ثابته مضاده للاكسده تحتوي على كميات عاليه من الاليسين والسيلنيوم كذلك كميات كبيره من المركبات الثابته العاليه الجوده والذائبه في الماء وهي مركبات الكبريت العضويه مثل S-allyl cystiene و S-allylmercopd cystine وهي غير موجوده في المستخلصات الباقيه . ان الAGE يعتبر كاسح لل Reactiv oxgen species ويزيد الانزيمات المضاده للاكسده Superoxid dismutas و glutathion catalase وglutathion peroxidas .اضافة الى احتواءه كميات عاليه من مركبات الفلافونيد خاصة مركب Resveratrol و Genistein [3].[4] التي تؤدي الى اصلاح وترميم خلايا Beta-cellوزيادة تضاعفها لتعمل على زيادة افراز الانسولين وتقليل تاثير نقصه على الخلايا المبيضيه وهكذا فان الهدف من الدراسة هو معرفة تأثيرالانسولين على الخصوبه من خلال دراسة النقص الحاصل فيه نتيجة اصابة الحيوانات التجريبيه بمرض السكري .كذلك دراسة تاثير مستخلص الثوم المعمر على رفع خصوبة الحيوان من خلال تاثيره على المبايض.

المواد وطرائق العمل

استخدم الالوكسان (شركةBDH.البريطانية) [5] استخدام الالوكسان الذي تم تحظيره وقت الحقن بجرعة 150) (mg/kg/ml من وزن الجسم اذ تمت اذابته بواقع (1g)من الالوكسان في (15سم3)من المحلول الفسلجي Normal salin.بعد تجويع الحيوانات لمدة (18) ساعه وبعد الحقن زودت مباشرةً بالغذاء ومحلول الكلوكوز (5%) لمنع الهبوط الحاد في تركيز سكر الدم نتيجة تحطم خلايا بيتا البنكرياسيه وتحرر كميات كبيره من الانسولين الذي يعمل على خفض تركيز السكر في الدم .[6] اما حيوانات السيطره السليمه فقد حقنت بـ(1سم3)ماء مقطر وقد تم التاكد من تحطم خلايا B.cell.الالوكسان هوماده متكونه من اتحاد اوكسيد الكلوريد مع البروتين الموجود في الدقيق ويطلق على الالوكسان الماده السامه لخلايا Betaحيث يسبب الضرر للحامض النووي DNA في خلايابيتا في البنكرياس وهذا يؤدي الى قصور هذه الخلايا وموتها .(2)

يحضر مستخلص الثوم المعمر بيقشير الثوم وتقطيعه الى شرائح ثم ينقع في الماء او الايثانول بتركيز (15-20 %) في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 شهر ثم يرشح بورق الترشيح من نوع whatman no. 1 تحت ضغط واطي ودرجة حرارة منخفضة [7] . ثم يذاب المستخلص في Dimethyl Sulfoyid (DMSO) بتركيز 5mg/ml ويخفف بنفس المادة عند الحاجة وتجرع الفئران بواقع 5ml يوميا .

استخدمت 30 انثى من الفئران قسمت عشوائيا الى ثلاثة مجاميع وهي GوG1وG2 تزن(175g- 150) ولها من العمر (2-3 اشهر)وضعت في اقفاص لدائنيه ذات اغطيه معدنيه فرشت بنشارة الخشب الناعمه وخضعت الحيوانت لظروف مختبريه من دوره ضوئيه 12ساعه ضوء و12ساعه ظلام وتثبت درجة الحراره على 2± 21 درجه مئويه وتم تغذية الفئران عليقه متوازنه واعطيت الماء في قناني خاصه ذي اثداء بلاستيكيه وبشكل مستمر طيلة فترة البحث.ثم جمعت عينات الدم عن طريق الوخز القلبي heart puncture وبواقع 5mlونبذت بسرعة 3000rpm\10mintes ثم تجمع الاصول وتجمد في درجة -20 ثم تهيئ للفحص الهرموني.ثم فحص مصول الدم لقياس كل من الLeutnizing Hormon وFollical Stimulating Hormonوالاستروجين والبروجستيرون والانسولين باتباع طرق الاليزا المختبريه باستخدام Kit من شركة Biosystemic الايطاليه.

التحليل الاحصائي

البيانات وضعت باستخدام Spss 16 وحللت ب ANOVAو عبر عنها بحساب المعدلات mean+-standard error.(M±S.EM.)واعتبر P<0.05ذو معنويه في الفحوصات [8] .

النتائج والمناقشه:

اظهرت النتائج في جدول رقم(1)قلة في مستوى تركيزالهرمونات في مصل دم الاناث بعد الحقن بمادة الالوكسان لاستحداث التلف في خلايا Beta cellالموجوده في جزر لانكرهانس في البنكرياس حيث ادى ذلك الى قلة مستوى الانسولين في الدم مؤدياً الى اظطراب في محاور تحت المهاد-النخامية-المبيض .

جدول رقم (1) متوسطات تراكيز الهرمونات الجنسية في مصل دم اناث الفئران المصابه تجريبيا بالسكري ,والمعالجه باستخدام AGE.

Parameter Group	FSH mlU/ml	LH mlU/ml	Estrogen Pg/ml	Progesteron ng//ml	Insolin MU\ml
Group G	0.56±0.02a	0.243±0.01a	8.501±0.02a	22.67±0.340a	68.69±2.33a MU\ml
Group G1	0.43±0.01b	0.101±0.001b	5.6±0.01 b	21.31±0.26b	37.44±66b MU/ml
Group G2	0.62±0.1c	0.308±0.04c	9.933±0.066c	26.01±0.172c	62.5±2.35c

Data =Mean+_S.E.M(n=5rat in each group)

القيم ذات الحروف المختلفه عموديا تختلف معنوياً بمستوى P<0.05.

ان تأثير الانسولين على المبيض قد يكون من خلال تأثيره على عملية تكوين الستيرويدات Steroidogensis التي تفرز من الخلايا الحبيبيه Graunlosa cell و Theca cell خلايا القراب تزيدمن افراز الاستروجين والبروجستيرون من خلال تأثيره على مستقبلات عوامل شبيه الانسولين العامل الاول IGFI (Insulin like Groth Factor 1) وهذا يتفق مع ما وصل اليه [1]وهذاما يفسر نقص هذين الهرمونين بعد التلف الحاصل في غدة البنكرياس .اما عند علاج هذه الحيوانات المصابه ب AGE فان زيادة مركبات الفلافونويد (3) في هذا النوع من المستخلصات قد ادى الى اصلاح التلف الحاصل في DNA خلايا Beta-cell وزيادة اعدادها خلال فترة المعالجه ثم زيادة افراز الانسولين .فان الانسولين يتداخل مع هرمونات القند gonado tropins حيث ان الانسولين يقوي الاستجابه الستيرويديه الى هرمونات القند في داخل الجسم وخارجه ففي الخلايا الحبيبيه فان هذا التاثير يتم عن طريق زياده عدد مستقبلات LH كذلك فان الانسولين بالتازر مع FSH فانه يزيد قدرة الاتحاد لهرمون LH على المبيض .بالاضافه الى ذلك فان الانسولين يزيد من حساسية النخاميه وتأثيرها ب GnRH ولذا فأن المصابين بمقاومة الانسولين يعطى لهم Insulin sensitizers وكذلك بالنسبه لمن عندهم انخفاض في مستوى LH وهذا ما يفسر قلة هرمونات FSHوLH بعد الاصابه بالسكري . كذلك فان الانسولين يعمل على نمو المبيض وتطور الجريبات المبيضيه حيث يحفز التضاعف الخلوي للخلايا الحبيبيه وخلايا القراب البينيه وهذا يتفق مع ما وجده [9] كذلك فان الانسولين يحدث تاثير تثبيطي لانتاج الهرمونات الجنسية المتحده بالكلوبيلين في الكبد(SHBG) .كذلك فان الانسولين يسيطر على بعض البروتينات المتحده مع عوامل النمو مثل IGFBPs والتي تؤثر على وظائف المبيض الخلويه والسريريه . كذلك من خلال تاثيره التحفيزي لانزيمات المبيض من الاروماتيز Oromatase وانزيم 17&Hydroxylase ان الانسولين وIGFs توقف الموت المبرمج apoptosis لجريبات المبيض وبذلك تقلل معدل الضمور فهي تؤثر على الاباضه وعموما فان نقص الانسولين في مرضى السكري من النوع الاول يرتبط مع اضطرابات الاباضه وعند حقن الفئران بمادة الالوكسان مستحدثين حالة السكري تتوقف الدوره المبيضيه وتضطرب المحاور الثلاثه تحت المهاد النخاميه –القند وتكون تحت النشاط الاعتيادي hxpoactiv وكذلك بسبب فشل GnRA. كما اظهرت النتائج انخفاض المؤشرات التكاثريه في جدول رقم 2 في الفئران المعامله بالالوكسان في مجموعة B عن الفئران التي عولجت باستخدام AGE.

جدول (2)تاثير مستخلص الثوم المعمر من بعض مؤشرات التكاثر في الفئران المستحدث فيها داء السكري

Reproductive index %	Fertility index* %	Gestation index ** %	Postnatal viability index *** %	Weaning viability index **** %
group G	75.4a	93a	93a	92a
group G1	60 b	70 b	60 b	70 b
group G2	80 c	80 c	80 c	90 c

الحروف المختلفه عموديا تشير لفرق معنوي على مستوى p<0.05

*موشر الخصوبة هو عدد الاناث الحوامل / عدد الاناث المتزاوجة × 100
**مؤشر الولادات هو عدد الاناث مع الجراء الحية / عدد الاناث الحوامل × 100
***موشر عيوشية بعد الولاده هو عدد الجراء الاحياء في اليوم الربع / عدد الجراء الاحياء × 100
****موشر عيوشية الجراء الفطيمة هو عدد الجراء الاحياء في يوم 21 / عدد الجراء الاحياء في يوم 4 × 100

ان حقن اناث الفئران البالغه بمادة الالوكسان ادى الى خفض مؤشرات التكاثر وعلاج هذه الفئران لمدة 28يوم بعد الحقن ب5ml من AGE قد رفع مؤشرات التكاثر الى مستوى معنويه عاليه .

ان علاج هذه الحيوانات بمادة الAGE وهو مستخلص الثوم المعمر ليس لان الثوم هو واحد من العوامل الدوائيه الطبيعية المضاده للاكسده فحسب بل لان الثوم المعمر بهذه الطريقه يصبح كابح لكل انواع الاوكسجين الفعاله Reactiv Oxgen Species(ROS) كذلك فان هذه الطريقه في تحظير الثوم تؤدي الى زيادة الانزيمات المضادة للاكسدة مثل انزيم Superoxid dismutasو Catalaseو Glutathion Peroxidas . كما ان تحظير الثوم بهذه الطريقه يطلق مركبات ذائبه بالماء مهمه جدا في تحفيز افراز الانسولين من خلاياBeta cell هي مركبات الفلافونويد ,التي لها دور كبير في حماية الخلا يا من تحطيم الDNA الذي تحدثه الاكسده [4].كما ان تاثير الثوم المعمر يؤدي الى زيادة تضاعف خلايا ال Beta cell واعادة اصلاحها [3] مما يزيد من فعالية AGE كونه يحتوي على تركيز عالي من Geinisteinو Reserveratrolوهي مركبات نباتيه فينوليه تؤثر على خلايا Beta cell في جزر لانكرهانس في البنكرياس فتزيد من معدل ما تفرزه من انسولين ما يؤثر به على المستقبلات الموجوده على المبيض فتزداد حساسيتها للتاثر بهرمون ال LHفتحدث الاباضه وتقل مدة Intervalالتي تؤخر التكاثر وتكون عائقا للخصوبه .

نستنتج من ذلك ان الAGE هو بحق Anti apoptosis الذي يحصل عند اصابة الحيوان Diapetes Typ1و Diapetes Typ2وPCOS .

المصادر

1-Lenoid poretsky , Nicolas A . Gataldo , Zev Rosewaks and Linda .C.Giudice The insulin Related ovarian Regulator systen in Health and disease . Endocrn Reviws . 2009 . Vol . 20 . no 4536-582 .

2- S. Kasuga , N . uda , E . Kyo , M . Ushijima , N . Morihara and y. itakura .pharmacologic activities of aged garlic extract in comparison with other garlic preperation . 2011 Nut . Rep . (1-6) . American Society of Nutritional Science .

3- Montserrat pinent , Anna Castell , isabel Baiges , Genma Monlagut , Lius Arola Anna Ardevol . (2008) , bioactivity of favonoids on insulin secreting cells .comperhensiv Reviews in food scince .

4- Shahriar Khadem; Robin J. Marles, Chromon and Flavonoi Alkaloids :occurence and Bioactivity . Molecules 2012 , 17 / 191-206 ; doi ;10.3390 .

5- Mahera N.A Shaikh , Maan H. AL-khalasi , Nameer . T . George. Journal , Iraq :postgraduat medical Journal, 2006, Vol; 5 issue 1 pag 110- 115 .(The Antagonistic role of cinnamon on destructive effect of Aloxan on the rattestis .Histo study .

6 - Sayed M . Rawi , Iman M. Mourad , Dawlat A . sayed . Biochemical chamges in experimental diabetes beffor and after treatment with mangifera indica psidium guave . int J pharm Biomed sci 2011,2(2) , 29-41

7- Nessar Ahmed , Khadijah Balamash , OMar Alber , Qiuyu wang . Effect of Kyolic aged garlic extract on glycaemia ,Lipidaemia and oxidative stress in patients with type -2 diabetes millitus Journal of diabetes resarch clinical metabolism . lss N 2050-0866.

8- جودة، احمد محفوظ. (2008) التحليل الاحصائي المتقدم باستخدام spss . الطبعة الاولى دار وائل للنشر ، عمان ، الاردن .

9- ST Butler , SH pelton and W R Butler . insuline increase 17-B estradiol production by the dominant follicle wave in dairy cows . 2009 iss N 1470-1626 (papor) .

10- Ralnasooriy,W.D.;Jayakody,J.;and prmakumara,G,(2009). Adverse pregnancy out come in rats Following to Salacia reticulate (celastracea) root extract - Braz J MED . Biol .Res 36:931 – 935. .