

Effect Of Insulin On conception of females of mouse and treatment of difficiency by aged garlic extract

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

د.أفتخار مهدي كاظم /مدرس
الكلية التقنية/المسيب /قسم تقنيات الإنتاج الحيواني

الخلاصة:-

اجريت الدراسة على (30) من اناث الفئران البيضاء البالغة ثم قسمت الى ثلاث مجاميع ،الاولى(G1) استحدثت فيها مرض السكري بحقتها 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 ، بروجسترون و الانسولين) كذلك تم قياس مؤشرات التكاثر (مؤشرات الخصوبة والحمل و عيوشية ما بعد الولادة و عيوشية الجراء الفطيمه) . أظهرت النتائج ارتفاع معنوي في مستوى الهرمونات ومؤشرات التكاثر بعد العلاج بـ AGE وهذا يدل على تأثير نقص الانسولين على خصوبة الحيوان بتأثيره على محاور (تحت المهاد-النخاميه-المبيض) والغاء هذا التأثير 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 experimentaly induced of diabetes mellitus by injection with (150mg/kg of .B.W per 1 ml) of Aloxan . the second group expermently included 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 Hyphthalmous - pituitary - ovary axise and the using of AgE was effectv in treatment and prevante the nagative effect of inslin difficiency .

المقدمة

الانسولين هو هرمون ببتيدي بنكرياسي ذو وزن جزيئي (5900 mo/wt) يتألف من (115) حامض اميني يفرز من خلايا cells Beta- الموجودة في جزر لانكرهانس وهو يلعب دور رئيسي بتنظيم ابيض كل من الكربوهيدرات والدهون والبروتين لذا فإن الاعضاء التقلديه الهدف للانسولين هي العضلات والانسجه الدهنيه والكبد واستمرت هذه الاعضاء لتكون الهدف طيلة العقود الماضيه ولم يكن معروفاً للانسولين دور مميز في تنظيم وظيفة المبايض والهرمونات القنديه gonadotropic وعلاقته بأصابة الحيوانات بمرض السكري أو تكيس المبايض المتعدد واضطراب التوازن الطاقي السليبي (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 المبيضية Stromal cell والخلايا الجريبية في المبيض لمعرفة تأثير الانسولين [1] وقد توسعت الدراسات لمعرفة انتاج المبايض وتأثير مايسمى بعامل النمو الشبيه بالانسولين من نوع IGF-I و IGF-II وكذلك اكتشاف البروتينات المتحده مع عوامل النمو IGFbps وتأثيرها على وظائف المبيض الخلويه السريرييه والمرضييه [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 بالسكري وتكيس المبايض وحالات مقاومة الانسولين extreme insulin resistance .المظاهر الفسلجيه والسريرييه لهذا الجهاز التنظيمي الذي يستخدم العوامل الدوائيه اصبحت واسعه الانتشار ولها تأثير اقتصادي كبير على الثروه الحيوانيه. كما ان العوامل الدوائيه لم تعد تقي 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 التكاثرية الجيده [2]. أن مستخلصات الثوم اخذت حيزاً كبيراً 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 ثابتة مضاده للاكسده تحتوي على كميات عاليه من الاليسين والسيلينيوم 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 Reactive oxgen species ويزيد الانزيمات المضاده للاكسده Superoxid dismutas و glutathion catalase و glutathion peroxidas . اضافة الى احتواءه كميات عاليه من مركبات الفلافونيد خاصة مركب Resveratrol و Genistein [3]. [4] التي تؤدي الى اصلاح وترميم خلايا Beta-cell وزيادة تضاعفها لتعمل على زيادة افراز الانسولين وتقليل تاثير نقصه على الخلايا المبيضييه وهكذا فان الهدف من الدراسة هو معرفة تاثير الانسولين على الخصوبه من خلال دراسة النقص الحاصل فيه نتيجة اصابة الحيوانات التجريبيه بمرض السكري . كذلك دراسة تاثير مستخلص الثوم المعمر على رفع خصوبه الحيوان من خلال تاثيره على المبايض.

المواد وطرائق العمل

استخدم الالوكسان (شركة BDH 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 مباشرة بالاعذاء 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 السيطرةه السليمه فقد حقنت بـ (1سم3) ماء مقطر وقد تم التأكد من تحطم خلايا B.cell الالوكسان هوامده متكونه من اتحاد اوكسيد الكلوريد مع البروتين الموجود في الدقيق ويطلق على الالوكسان ماده السامه لخلايا Beta حيث يسبب الضرر للحمض النووي DNA في خلايا بيتا في البنكرياس وهذا يؤدي الى قصور هذه الخلايا وموتها . (2) يحضر مستخلص الثوم المعمر ببقسير 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 1 whatman تحت ضغط واطي ودرجة حرارة منخفضة [7] . ثم يذاب المستخلص في Dimethyl Sulfoiyd (DMSO) بتركيز 5mg/ml ويخفف بنفس ماده عند الحاجة وتجرع الفئران بواقع 5ml يومياً .

استخدمت 30 انثى من الفئران قسمت عشوائيا الى ثلاثة مجاميع وهي G1 وG2 وG3 تزن (150-175g) ولها من العمر (2-3 اشهر) وضعت في اقفاص لدائنيه ذات اغطيه معدنيه فرشت بنشارة الخشب الناعمه وخضعت الحيوانات لظروف مختبريه من دوره ضوئيه 12ساعه ضوء و12ساعه ظلام وتثبتت درجة الحراره على 21 ± 2 درجة مئوية وتم تغذية الفئران عليه متوازنه واعطيت الماء في قناني خاصه ذي اثناء بلاستيكيه وبشكل مستمر طيلة فترة البحث ثم جمعت عينات الدم عن طريق الوخز القلبي heart puncture وبواقع 5ml ونبذت بسرعة 3000rpm\10minetes ثم تجمع الاصول وتجمد في درجة -20 ثم تهيئ للفحص الهرموني. ثم فحص مصول الدم لقياس كل من الLeutnizing Hormon وFollical Stimulating Hormon والاستروجين والبروجستيرون والانسولين باتباع طرق الاليزا المختبريه باستخدام Kit من شركة Biosystemic الايطاليه.

التحليل الاحصائي

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

النتائج والمناقشه:

اظهرت النتائج في جدول رقم(1) قلة في مستوى تركيز الهرمونات في مصل دم الاناث بعد الحقن بماده الالوكسان لاستحداث التلف في خلايا Beta cell الموجوده في جزر لانكرهانس في البنكرياس حيث ادى ذلك الى قلة مستوى الانسولين في الدم مؤدياً الى اظطراب في محاور تحت المهاده-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
Group G1	0.43±0.01b	0.101±0.001b	5.6±0.01 b	21.31±0.26b	37.44±66b
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 المختلفة عمودياً تختلف معنوياً بمستوى $P < 0.05$.

ان تأثير الانسولين على المبيض قد يكون من خلال تأثيره على عملية تكوين الستيرويدات Steroidogenesis التي تفرز من الخلايا الحبيبية Graunlosa cell و Theca cell خلايا القراب تزيد من افراز الستيروجين والبروجسترون من خلال تأثيره على مستقبلات عوامل شبيهة الانسولين العامل الاول IGF1 (Insulin like Groth Factor 1) وهذا يتفق مع ما وصل اليه [1] وهذا ما يفسر نقص هذين الهرمونين بعد التلف الحاصل في غدة البنكرياس. اما عند علاج هذه الحيوانات المصابة 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 المعالجة ثم زيادة افراز الانسولين. فان الانسولين يتداخل مع هرمونات القند gonado tropins حيث ان الانسولين يقوي الاستجابة الستيرويدية الى هرمونات القند في داخل الجسم وخارجه ففي الخلايا الحبيبية فان هذا التأثير يتم عن طريق زياده عدد مستقبلات LH كذلك فان الانسولين بالتازر مع FSH فانه يزيد قدرة الاتحاد لهرمون LH على المبيض. بالاضافة الى ذلك فان الانسولين يزيد من حساسية النخاميه وتأثيرها ب GnRH ولذا فان المصابين بمقاومة الانسولين يعطى لهم Insulin sensitizers وكذلك بالنسبة لمن عندهم انخفاض في مستوى LH وهذا ما يفسر قلة هرمونات LH وFSH بعد الاصابه بالسكري. كذلك فان الانسولين يعمل على نمو المبيض وتطور الجريبات المبيضية حيث يحفز التضاعف الخلوي للخلايا الحبيبية وخلايا القراب البينية وهذا يتفق مع ما وجد [9] كذلك فان الانسولين يحدث تأثير تثبيطي لانتاج الهرمونات الجنسية المتحده بالكوليبلين في الكبد (SHBG). كذلك فان الانسولين يسيطر على بعض البروتينات المتحده مع عوامل النمو مثل IGFs والتي تؤثر على وظائف المبيض الخلويه والسريرييه. كذلك من خلال تأثيره 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 دوره المبيضية وتضطرب المحاور الثلاثة تحت المهاد النخاميه - القند وتكون تحت النشاط الاعتيادي hpxoactiv وكذلك بسبب فشل GnRA. كما اظهرت النتائج انخفاض المؤشرات التكاثرية في جدول رقم 2 في الفئران المعامله بالالوكسان في مجموعة B عن الفئران التي عولجت باستخدام AGE.

جدول (2) تأثير 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 عمودياً تشير لفرق معنوي على مستوى $p < 0.05$

*مؤشر الخصوبة هو عدد الاناث الحوامل / عدد الاناث المتزاوجة $\times 100$

**مؤشر الولادات هو عدد الاناث مع الجراء الحية / عدد الاناث الحوامل $\times 100$

***مؤشر عيوشية بعد الولادة هو عدد الجراء الاحياء في اليوم الرابع / عدد الجراء الاحياء $\times 100$

****مؤشر عيوشية الجراء الفطيمة هو عدد الجراء الاحياء في يوم 21 / عدد الجراء الاحياء في يوم 4 $\times 100$

ان حقن اناث الفئران البالغه بمادة الالوكسان ادى الى خفض مؤشرات التكاثر وعلاج هذه الفئران لمدة 28يوم بعد الحقن ب 5ml من AGE قد رفع مؤشرات التكاثر الى مستوى معنويه عالبه .

ان علاج هذه الحيوانات بمادة الAGE وهو مستخلص الثوم المعمر ليس لان الثوم هو واحد من العوامل الدوائيه الطبيعیه المضاده للاكسده فحسب بل لان الثوم المعمر بهذه الطريقه يصبح كايح لكل انواع الاوكسجين الفعاله

ROS)Reactiv Oxgen Species) كذلك فان هذه الطريقه في تحظير الثوم تؤدي الى زيادة الانزيمات المضاده للاكسده مثل انزيم Superoxid dismutas وCatalase وGlutathion Peroxidas . كما ان تحظير الثوم بهذه الطريقه يطلق

مركبات ذاتيه بالماء مهمه جدا في تحفيز افراز الانسولين من خلاياBeta cell هي مركبات الفلافونويد ،التي لها دور كبير في حماية الخلايا من تحطيم الDNA الذي تحدثه الاكسده [4]. كما ان تأثير الثوم المعمر يؤدي الى زيادة تضاعف خلايا الBeta cell

وإعادة اصلاحها [3] مما يزيد من فعالية AGE كونه يحتوي على تركيز عالي من Geinistein وReserveratrol وهي

مركبات نباتيه فينولية 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 الLH فتحدث الاباضه وتقل مدة Interval التي تؤخر التكاثر وتكون عائقا للخصوبه .

نستنتج من ذلك ان الAGE هو بحق Anti apoptosis الذي يحصل عند اصابة الحيوان Diapetes وDiapetes Typ2 . PCOS وTyp2 .

المصادر

- 1-Lenoid poretsky , Nicolas A . Gataldo , Zev Rosewaks and Linda .C.Giudice The insulin Related ovarian Regulator system 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 :ocurrence 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 Aloxa on the rattestis .Histo study .
- 6 - Sayed M . Rawi , Iman M. Mourad , Dawlat A . sayed . Biochemical changes 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 . Iss 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.