مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت)
دوره ۱۱ شماره ۳ مرداد و شهریور ۱۳۹۶، ۳۶۰-۳۵۱

مقاله پژوهشی

اثر مقادیر مختلف عصاره ی هیدروالکلی یونجه بر کنترل استرس اکسیداتیو نیکوتین در تخمدان موش صحرایی ماده

سجاد سیستانی[۱]، دکتر مهدیه رئیس زاده[۲]، دکتر علی اکبر امیری[۳]

دریافت مقاله : آذر ۱۳۹۵
پذیرش مقاله : فروردین ۱۳۹۶

*نویسنده مسئول :
دکترمهدیه رئیس زاده؛
دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج

Email :
mraes@iausdj.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: با توجه اهمیت ناباروری ناشی از القای استرس اکسیداتیو نیکوتین، هدف از این مطالعه بررسی عصاره ی هیدروالکلی یونجه در تقابل با اثر نیکوتین بر بافت تخمدان در موش صحرایی ماده بود.

روش بررسی: ۲۴ سر موش صحرایی ماده بالغ به صورت تصادفی به ۴ دسته که شامل کنترل(بدون تیمار) و گروه های آزمایش T1، T2 و T3 تقسیم شدند. به گروه T1 تزریق زیرپوستی نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و گروه‌های T2، T3 به ترتیب علاوه بر نیکوتین، عصاره ی هیدروالکلی یونجه با مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت ۲۵ روز تجویز شد. در روز آخر حیوانات وزن‌گیری شدند. از قلب حیوانات خون‌گیری و سرم برای اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جدا شد. بعد از آسان‌کشی موش‌ها با دوز بالای تیوپنتال، تخمدان‌ها خارج و وزن‌گیری شد. تخمدان راست برای اندازه‌گیری غلظت مالون‌دی‌آلدئید، و تخمدان چپ برای شمارش فولیکول‌های اولیه، ثانویه، گراف، آترتیک و جسم زرد فیکس و رنگ‌آمیزی شد.

یافته‌ها: وزن حیوانات در گروه T1 (۲۱۹ گرم)، کاهش ۱۰ درصدی داشت و این میانگین با گروه کنترل، T2 و T3 معنی‌دار شد. بیشترین وزن تخمدان در گروه T3 (۱۴۶/۶۶±۸/۹۴) میلی گرم مشاهده شد. گروه T3 میانگین فولیکول‌های اولیه، گراف و جسم زرد بیشتر از گروه T1، اما اترتیک فولیکول کمتر از گروه T1 شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید گروه کنترل ۰/۰۱±۰/۳۵ میکرومول بر میلی‌لیتر از بقیه گروه‌ها کمتر و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گروه T3 ۳/۲۵±۸۲۱/۱۸ میکرومول بر میلی‌لیتر بیشتر از T1 ۱۲/۴۴±۷۰۸/۸۵ و معنی‌دار شد.

نتیجه‌گیری: عصاره ی هیدروالکلی یونجه می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از نیکوتین را بر بافت تخمدان کاهش داده و وضعیت باروری را احتمالا بهبود بخشد.

واژه های کلیدی: عصاره ی هیدرالکلی یونجه، نیکوتین، استرس‌اکسیداتیو، تخمدان، موش‌صحرایی‌ماده

[۱] دکتری عمومی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
[۲] استادیار فارماکولوژی، گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
[۳] مربی علوم تشریح، گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

مقدمه

در شرایط طبیعی بدن، بین تولید و حذف رادیکال های آزاد تعادل وجود دارد. عدم تعادل در این فرایند موجب استرس اکسیداتیو خواهد شد. افزایش استرس اکسیداتیو، گلوتاتیون بافتی را تخلیه کرده و به افزایش رادیکال های آزاد منجر می شود(۱). استرس اکسیداتیو در نتیجه ی تخریب اکسیداتیو ماکرومولکول های بیولوژیک مانند اسید نوکلوئیک، پروتئین ها، چربی ها و کربوهیدرات ها توسط رادیکال های آزاد ایجاد شده و بنابراین اثرات سایتوتوکسیک ایجاد می‌شود(۲).

شواهد موجود نشان می‌دهد که سطوح بالای استرس اکسیداتیو سبب ایجاد فرایندهای پاتولوژیکی مانند آندومتریوز، ناباروری با عامل ناشناخته، پره آکلامپسی، سقط مکرر، و سندرم تخمدان پلی کیستیک شده و احتمالا در افزایش تولید آندورژن های تخمدانی و انسولین نیز دخالت دارند و لیکن کنترل شدن استرس اکسیداتیو سبب تسهیل عملکردهای فیزیولوژیک باروری در زمینه های بلوغ اووسیت ها، فولیکولوژنز، تولید تخمدانی استروئیدها، لوتئولیز، تخمک گذاری، تغییرات دوره ای آندومتر و قاعدگی خواهد شد(۴و۳).

کاهش استرس اکسیداتیو با تجویز آنتی اکسیدان ها می تواند سبب کاهش اثرات بالقوه و مخرب رادیکال های آزاد اکسیژن و در نتیجه افزایش تعداد، کیفیت اووسیت ها و فولیکول ها و همچنین مهار آپوپتوز فولیکول های تخمدان شود(۵و۴).

نیکوتین یکی از ترکیبات اپیوئیدی است که می تواند از طریق القای استرس اکسیداتیو سبب کاهش ناباروری شود. یونجه با داشتن خواص آنتی اکسیدانی مانند فیتواستروژن ها، فلاوونوئیدها و ویتامین های C و E احتمالا می تواند سبب کنترل اثرات عوامل اکسیدان گردد(۶). هم چنین در مطالعات گذشته به اثرات مشابه استرادیول عصاره ی یونجه در افزایش غلظت استروژن، افزایش وزن ارگان های جنسی بدون عوارض جانبی اشاره شده است(۷).

با توجه به اهمیت و سهولت دسترسی به یونجه و افزایش رو به رشد مصرف نیکوتین از طریق استعمال دخانیات در جوامع امروزی، هدف از این مطالعه بررسی تاثیرات متقابل عصاره ی هیدروالکلی یونجه در کنترل استرس اکسیداتیو ناشی از نیکوتین در تخمدان موش صحرایی ماده بود. به نحوی که دستیابی به نتایج این پژوهش می تواند زمینه ساز ساخت ترکیبات دارویی برگرفته از گیاه یونجه، در بهبود وضعیت فولیکولی تخمدان با کنترل عوامل اکسیدان شود.

روش بررسی

این تحقیق از نوع مطالعات تجربی مداخله‌ای بر روی ۲۴ سر موش صحرایی ماده ی بالغ از نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت.

حیوانات در شرایط استاندارد، حرارت ۲۰-۱۸ درجه سانتی گراد و دوره شبانه روزی ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در حیوان خانه ی دانشکده دامپزشکی سنندج نگه داری شدند. آب سالم و غذا به صورت کنسانتره(ساخت شرکت دام پارس تهران) در طول دوره ی آزمایش در اختیار آنها قرار گرفت. در ارتباط با رعایت اصول اخلاقی کار، مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان قرار گرفت.

موش های صحرایی به صورت تصادفی در ۴ گروه جداگانه و در هر گروه ۶ سر تقسیم بندی شدند. گروهها به صورت زیر بود:

گروه کنترل: بدون هرگونه تیمار

گروه آزمایش اول(T1): تجویز زیرپوستی نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز انجام شد.

گروه آزمایش دوم(T2): علاوه بر تجویز زیرپوستی نیکوتین ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم، عصاره ی هیدروالکلی یونجه به صورت خوراکی ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت ۲۵ روز داده شد.

گروه آزمایش سوم(T3): علاوه بر تزریق زیرپوستی نیکوتین ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم، عصاره هیدروالکلی یونجه به صورت خوراکی ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز به موش ها تجویز شد.

در روز آخر، برای اطمینان از هم سیکلی حیوانات اسمیر واژن تهیه شد. در صورت تفاوت سیکل جنسی، موش های مورد نظر یک یا دو روز با تاخیر مورد آزمایش های بعدی قرار گرفتند.

از قلب موش ها در هر گروه خون گیری شد. سپس با سانتریفیوژ دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، سرم برای اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم جداسازی شد. سپس بعد از وزن گیری، حیوانات در هر گروه به روش آسان کشی(اوردوز تیوپنتال) معدوم شدند(۸).

جهت برداشت تخمدان، ابتدا حفره‌ی شکم باز شد، سپس تخمدان از بافتهای اطراف جدا گردید. پس از جداسازی چربیها و بافتهای اضافی اطراف تخمدان، تخمدان توسط ترازوی دیجیتال وزن شد. سپس بلافاصله تخمدان چپ در محلول تثبیت کننده‌ی فرمالین بافر۱۰ درصد غوطه‌ور شد و مراحل مربوط به تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی‌های هماتوکسین – ائوزین انجام شد(۹).

سلولهای مختلف بافت تخمدان از جمله فولیکول‌های اولیه، ثانویه، گراف، اترتیک فولیکول و جسم زرد با میکروسکوپ نوری بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ در هر گروه بررسی و شمارش گردید.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

تخمدان راست برای اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید با روش تیوباربیتوریک اسید به صورت تازه مورد استفاده قرار گرفت.

روش تهیه عصاره ی هیدروالکلی یونجه

برای تهیه‌ی عصاره ی هیدروالکلی گیاه یونجه، ابتدا گیاه یونجه تهیه شده سپس این گیاه به مدت ۷۲ ساعت جهت خشک شدن در جای خنک و به دور از نور خشک شد. گیاه کامل توسط آسیاب به صورت پودر درآمد. سپس ۱۵۰ گرم از پودر خشک را با اتانول ۷۵ درصد به حجم یک لیتر رسانیده پس از ۴۸ ساعت غوطه ور سازی، با صافی صاف نموده و سپس با سانتریفیوژ ۲۵۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه کاملاً جرم گیری می کنیم. عصاره ی به دست آمده تحت خلا با روتاری تغلیظ و خشک شد. سپس غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آن با آب مقطر استریل تهیه شد(۱۰).

روش تهیه محلول تزریقی نیکوتین

از نمک نیکوتین هیدروژن تارتارات تهیه شده از شرکت سیگما- آلدریچ Lot No=029H046 استفاده شد. محلول ۰/۱ درصد در آب مقطر استریل تهیه و جهت تزریق زیرپوستی استفاده گردید.

اندازه گیری مالون دی آلدئید در بافت تخمدان

از بافت تخمدان راست برای تعیین میزان مالون دی آلدئید Malondialdehyde (MDA) که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهاست استفاده شد(۱۱). به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه ۱/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته به آن ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۶۷ درصد اضافه کردیم و محلول سپس به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش گذاشته شد. سپس ۲ میلی‌لیتر n- بوتانول به آن اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱ و ۱ و ۳ و ۳ تتراتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شد. محلول استاندارد مالون دی آلدئید در غلظت‌های ۲-۰/۲ میکرومولار در اسید سولفوریک ۱ درصد تهیه شد(۱۱). غلظت مالون دی آلدئید بر حسب میکرومول بر میلی لیتر محاسبه گردید.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم

برای سنجش ظرفیت تام آنتی اکسیدانی از روش ارایه شده توسط بنزی و همکاران به نقل از Cerrato با نام روش Ferric-reducing ability of plasma (FRAP) استفاده شد(۱۲). اصول کار در این روش، توانایی سرم در احیای یون فریک اندازه‌گیری می‌شود. در pH اسیدی، زمانی که کمپلکس 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine(TPTZ)-FeIII به FeII احیا می‌گردد تولید رنگ آبی نموده که در طول موج ۵۹۳ نانومتر جذب نوری را دارد. مقادیر Total capacity antioxidant (TCA) با استفاده از نمودار استاندارد غلظت ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرومول بر لیتر سولفات آهن اندازه گیری می‌شود(۱۲).

داده‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد و میانگین آن در گروه‌های آزمایش کنترل با یکدیگر مقایسه شد. به منظور مقایسه میانگین‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی استفاده شد(۱۳). سنجش آماری داده‌ها با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS 21 انجام و سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ درنظرگرفته شد.

یافته‌ها

براساس نتایج به دست آمده در روز بیست وششم، بیشترین وزن موش ها در گروه کنترل با وزن تقریبی ۲۵۵ گرم و کمترین وزن در گروه آزمایش اول(T1) با متوسط ۲۱۹ گرم بود. اختلاف وزن موش ها در گروه کنترل با وزن موش ها در گروه آزمایش دوم ۲۲۶ گرم و معنی دار شد. به جز در گروه کنترل در بقیه گروه ها کاهش وزن نسبت به روز اول مطالعه وجود داشت. این کاهش وزن در گروه آزمایش اول با بیشترین میزان حدود ۱۰ درصد وزن اولیه دیده شد.

جدول ۱: Mean±sem وزن تخمدان و شمارش فولیکول های تخمدان در گروه‌های مورد مطالعه

پارامترها / گروهها	وزن تخمدان میلی گرم	فولیکولهای اولیه	فولیکولهای ثانویه	فولیکولهای گراف	فولیکولهای اترتیک	جسم زرد
گروه کنترل	۱۴۶/۶۶±۴/۰۲	۴/۵±۰/۲۲	۲/۸۳±۰/۳۰	۳/۸۳±۰/۶۵	۳/۱۶±۰/۱۶ *، **، ***	۲/۱۶±۰/۱۶ *
گروه T1	۱۲۰±۳/۴۱*	۳/۶۶±۰/۳۳ *	۲/۵±۰/۴۲	۳/۶۶±۰/۲۱ *	۶±۰/۲۵ *	۱/۱۶±۰/۱۶ **

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

گروه T2	۱۳۳/۳۳±۳/۳۳	۵/۵±۰/۴۲	۴/۵±۰/۳۴	۳/۶۶±۰/۸۷	**۵/۸۳±۰/۳۰	۳/۱۶±۰/۲۱
گروه T3	*۱۴۶/۶۶±۸/۹۴	* ۵/۸۳±۰/۴۷	۳/۳۳±۰/۲۱	*۵/۱۶±۰/۱۶	*** ۵±۰/۴۴	**,* ۳/۳۳±۰/۱۶

گروه کنترل: بدون تیمار

گروه T1: دریافت نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز

گروه T2: عصاره ی یونجه ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز

گروه T3 : عصاره ی یونجه ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز

*،**،*** به صورت ستونی و همسان(از نظر تعداد)، نشان بر اختلاف آماری معنی دار P<۰/۰۵ بین آن دو گروه است

بر اساس جدول ۱، وزن تخمدان در گروه T3 (۱۴۶ میلی گرم) و گروه کنترل بیشترین میزان وزن تخمدان گروهها بودند. در گروه T1 کمترین وزن تخمدان با وزن حدود ۱۲۰ میلی‌گرم بود. اختلاف بین وزن تخمدان بین گروه T3 با گروه T1 معنی دار شد. می توان گفت با توجه به استرس اکسیداتیو نیکوتین روند فولیکولوژنز در تخمدان مختل شده که سبب کاهش معنی دار وزن تخمدان شده است. این استرس اکسیداتیو در گروه های عصاره هیدروالکلی یونجه با توجه به پتانسیل های آنتی اکسیدانی و فیتواستروژنیک کنترل به نحوی که در عصاره با مقدار ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم با گروه کنترل همراستا شد.

بیشترین میانگین تعداد فولیکول های اولیه تخمدان در گروه عصاره ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم حدود ۵/۸۳ و کمترین در گروه T1 (تجویز نیکوتین ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم) ۳/۶۶ بود. به نحوی که این اختلاف در سطح P<۰/۰۵ معنی دار شد. در ارتباط با فولیکول های ثانویه و گراف نیز کمترین میانگین تعداد در گروه T1 و بیشترین میانگین در گروه T3 مشاهده شد. این اختلاف آماری معنی دار نبود. در مورد اترتیک فولیکول بیشترین میانگین در گروه T1 با میانگین ۶/۰ عدد و کمترین در گروه کنترل ۳/۱۶ دیده شد. اختلاف میانگین تعداد فولیکول های اترتیک در گروه کنترل با گروه T1، T2 و T3 معنی دار است(P<۰/۰۵۵). بیشترین میانگین تعداد جسم زرد در گروه T3 با میانگین ۳/۳۳ و کمترین در گروه T1 با میانگین ۱/۱۶ وجود داشت. اختلاف آماری معنی داری بین میانگین جسم زرد در گروه T3 با گروه T1 و کنترل بود.

جدول ۲: بررسی اختلافات آماری معنی دار وزن تخمدان و سلولهای مختلف گروه کنترل با گروه‌های T1,T2,T3

پارامترها / گروه	وزن تخمدان	فولیکولهای اولیه	فولیکولهای ثانویه	فولیکولهای گراف	فولیکولهای اترتیک	جسم زرد
F	۲/۳۸	۷/۴۴	۳/۹۵	۱/۷۶	۳۱/۶۲	۲۲/۱۱
Sig	*۰/۰۴	*۰/۰۰	*۰/۰۰	۰/۱۵	*۰/۰۰	*۰/۰۰

F: یا کسر F که در صورت این کسر اختلاف بین گروه و در مخرج آن اختلاف درون گروه را مشخص می کند. هر چه کسر F عدد بزرگتری باشد به احتمال بیشتری اختلافات از نظر آماری معنی دار است

*اختلاف آماری معنی دار P<۰/۰۵ دیده شد

بر اساس جدول ۲، میانگین وزن تخمدان، تعداد فولیکول اولیه، اترتیک و جسم زرد در گروه T1 که تجویز نیکوتین و بیشترین استرس اکسیداتیو را داشته با سایر گروه های آزمایش معنی دار شد.

با توجه به استفاده از نیکوتین و اعمال استرس اکسیداتیو و ایجاد رادیکال آزاد، بیشترین آسیب فولیکولی که سبب آتروفی فولیکول‌ها شده است در گروه T1 مشاهده شد. کمترین تعداد فولیکول آترتیک در گروه T3 بوده که با توجه به استفاده از عصاره ی هیدروالکلی یونجه با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در این گروه و احتمالا بیشترین غلظت ترکیبات فیتواستروژنیک، فلاوونوئیدها و سایر ترکیبات آنتی اکسیدان دیگر از جمله ویتامین C، آسیب اتروفی فولیکولی ناشی از استرس اکسیداتیو نیکوتین به حداقل خود رسیده است.

جدول ۳: Mean±sem مالون دی آلدئید(MDA) و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم(TCA) گروه‌های مورد مطالعه

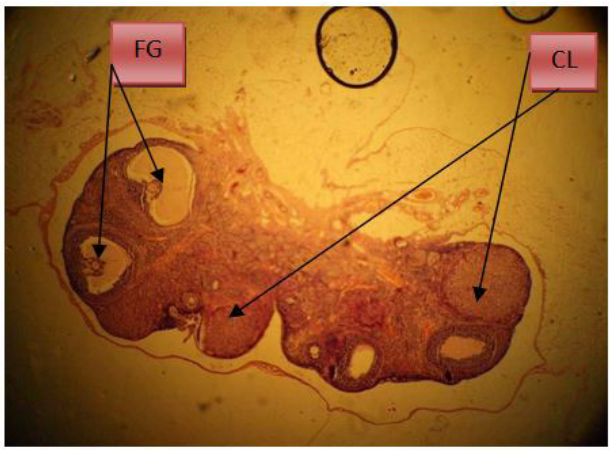
گروه	MDA(µmol/ml)	TCA(µmol/ml)
گروه کنترل	***,**,*۰/۳۵±۰/۰۱	۷۸۰/۶۶±۳۴/۸۶
گروه T1	*۰/۶۷±۰/۰۱	*۷۰۸/۸۵±۱۲/۴۴

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

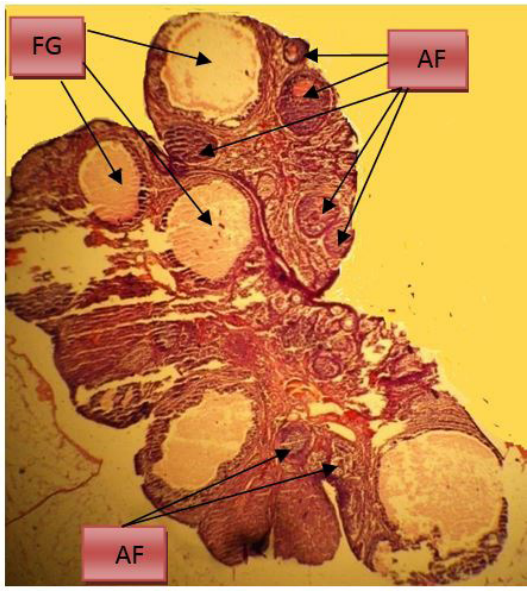
گروه T2	**۰/۶۴±۰/۰۰	۷۵۰/۴۳±۱۲/۸۴
گروه T3	***۰/۶۲±۰/۰۴	*۸۲۱/۱۸±۳/۲۵

گروه کنترل: بدون تیمار
گروه T1: دریافت نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز
گروه T2: عصاره ی یونجه ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز
گروه T3: عصاره ی یونجه ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و نیکوتین ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز
*،**،*** به صورت ستونی و همسان(از نظر تعداد)، نشان اختلاف آماری معنی دار P<۰/۰۵ بین آن دو گروه است

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول ۳، بیشترین میانگین غلظت مالون دی آلدئید در گروه T1 حدود ۰/۶۷ میکرومول بر میلی‌لیتر و کمترین در گروه کنترل با میانگین ۰/۳۵ مشاهده شد. در ارتباط با ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم بیشترین میزان در گروه T3 با میانگین حدود ۸۲۱/۱۸ و کمترین در گروه T1 با میانگین ۷۰۸/۸۵ میکرومول بر میلی لیتر به دست آمد. ظرفیت آنتی اکسیدانی در گروه T3 بیش از گروه کنترل شد. اختلاف آماری معنی داری بین ظرفیت آنتی اکسیدان سرم در گروه T1 با T3 وجود داشت.

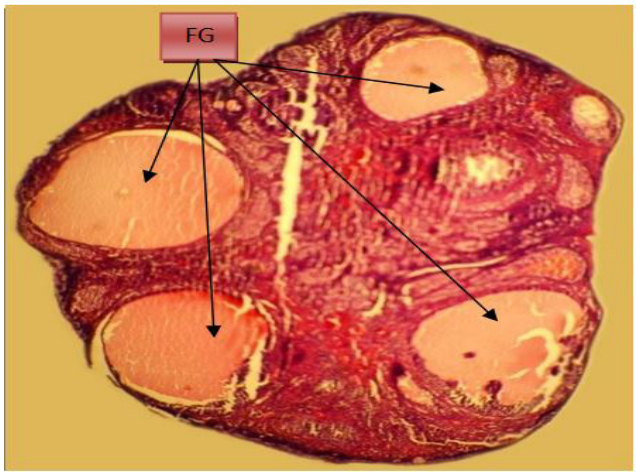


شکل ۱: نمای میکروسکوپی تخمدان با بزرگنمایی ۴۰ در موش‌های گروه کنترل، رنگ آمیزی هماتوکسیلین_ائوزین، فولیکول گراف(FG) جسم زرد(CL)

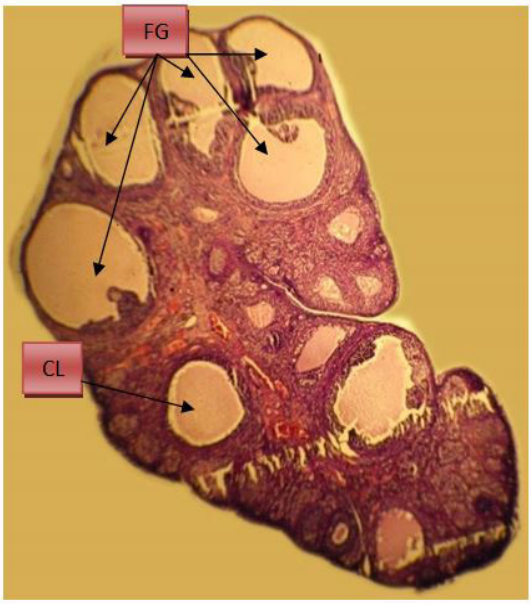


شکل ۲: نمای میکروسکوپی تخمدان با بزرگنمایی ۴۰ درموش‌های گروه T1، رنگ آمیزی هماتوکسیلین_ائوزین، فولیکول گراف(FG) فولیکول آتریک(AF)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]



شکل ۳: نمای میکروسکوپی تخمدان با بزرگنمایی ۴۰ درموش‌های گروه T1، رنگ آمیزی هماتوکسیلین_ائوزین، فولیکول گراف(FG)



شکل ۴: نمای میکروسکوپی تخمدان با بزرگنمایی ۴۰ در موش‌های گروه T2، رنگ آمیزی هماتوکسیلین_ائوزین، فولیکول گراف(FG)، جسم زرد(CL)

با توجه به فراوانی بیشتر انواعی از سلولها، اشکال ۱ تا ۴ به عنوان برش های عرضی بافت تخمدان در موش های مورد مطالعه در هر گروه آورده شده است. به نحوی که این شکل ها در تکمیل اطلاعات جداول ذکر شده و مقایسه های صورت گرفته، می باشد.

بحث

نیکوتین یک آلکالوئید دارویی فعال و ماده ای اعتیاد آور است و اثرات آن برروی سیستم تناسلی و باروری، بارها بررسی شده است(۱۴). برای مثال نیکوتین با القای افزایش ترشح کاتکول آمین‌ها، ایسکمی گنادها را سبب می شود.

Helen و همکاران در سال ۲۰۰۰ به اثرات ایجاد رادیکال‌های آزاد ایجاد شده توسط نیکوتین طی متابولیسم آن اشاره نمودند. آنان این مسئله را سبب افزایش پراکسیداسیون چربی ها دانستند(۱۵). Aydos و همکاران در پژوهش خود نیکوتین را سبب القای آپوپتوز و کاهش ناباروری در دو جنس دانستند(۱۶).

یونجه یا Alfalfa گیاهی است علفی از تیره‌ی بقولات، سرشار از ویتامین‌های A، C، E، K و دارای ترکیبات فلاوونوئیدی، فلاوون ها و ایزوفلاوون ها. از ایزوفلاوون‌ها خواص آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی و ضد التهابی گزارش شده است(۱۷). نتایج حاصل از پژوهش دیگر نشان داده است که ایزوفلاون‌ها و اعمالشان روی ترکیبات بدن و فاکتورهای موثر در ایجاد روند یائسگی در زنان اثرات مثبتی می‌تواند داشته باشد(۱۸).

در مطالعه ی ثمری و همکاران به اثرات آنتی اکسیدانی، فلاوونوئیدی و ویتامین C موجود در عصاره هیدروالکلی یونجه که سبب تسریع بهبود زخم ناشی از اسید استیک در معده ی موش صحرایی شده بود نیز اشاره کرده اند(۱۹).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

در مطالعه ای که Contero و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام دادند، عصاره ی هیدروالکلی یونجه را به صورت تزریقی دارای خواص استروژنیک دانسته و این مسئله در دوز ماکزیمم تحقیق سبب افزایش وزن تخمدان، رحم و افزایش سطح استروژن سرم در موش صحرایی ماده شد. آنان این اثر را وابسته به دوز اعلام نمودند(۷).

در مطالعه Ahmad و همکاران در سال ۲۰۱۳ اعلام شد عصاره ی متانولی یونجه در دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب افزایش سطح استرادیول و هم چنین افزایش سطح پروتئین های تام سرم و کاهش سطح کلسترول تام می شود. هم چنین با اندازه گیری آنزیم های کبدی AST, ALT و اوره این اثرات بدون عوارض جانبی وارد شده به کبد و کلیه است(۶).

بر اساس نتایج به دست آمده از این مطالعه، تجویز نیکوتین به موش صحرایی ماده با افزایش غلظت مالون دی آلدئید سبب القای استرس اکسیداتیو و آسیب روند رشد فولیکول و ایجاد فولیکول های اترتیک می شود. تاثیر متقابل عصاره های ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم یونجه، سبب کنترل استرس اکسیداتیو القایی شد. به نحوی که میانگین فولیکول های اولیه، گراف و جسم زرد را مخصوصا در ماکزیمم مقدار افزایش داد. هم چنین کاهش معنی دار میانگین فولیکول آترتیک در این مطالعه نشانگر خواص مثبت این ترکیبات در مهار روند آپوپتوز و در نتیجه کاهش آترزی فولیکولی می باشد.

با توجه به افزایش غلظت ظرفیت آنتی اکسیدانی در گروه عصاره ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم و مطالعات گذشته این اثرات را می توان به مواد موثر موجود در عصاره از جمله ویتامین C، فلاوونوئیدها و ایزوفلاوون ها نسبت داد.

در مطالعه ی خسروی و همکاران سال ۱۳۹۵ اثربخشی عصاره آبی یونجه در کنترل قند و چربی خون در موش های صحرایی دیابتی را با توجه به اینکه دیابت یکی از علل استرس اکسیداتیو نیز می باشد، تایید نمودند(۲۰).

در مطالعه ای که حسینی آغوزی و همکاران در سال ۱۳۹۴ در خصوص تاثیر عصاره یونجه بر سرطان پستان موش به صورت آزمایشگاهی انجام دادند، اعلام نمودند که عصاره ی یونجه با اثر بر روی میزان استرادیول و پروفیل لیپید در موش های مبتلا به سرطان پستان می تواند در بهبود شرایط بیماری موثر واقع شود(۲۱).

در پژوهشی که نباتچیان و همکاران در سال ۱۳۹۵ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم می تواند در کاهش ریسک سرطان پستان القایی در موش موثر واقع شود(۲۲)، که با نتایج مطالعه ی به دست آمده مبنی بر اینکه با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی، استرس اکسیداتیو ناشی از نیکوتین در تخمدان کنترل می یابد، مطابقت داشت.

در مطالعه ی Bendich در سال ۱۹۸۶ افزایش تراکم رادیکال آزاد ناشی از دود سیگار و متعاقب آن افزایش مقدار اکسیدان های موجود در ریه را سبب کاهش سطح سرمی آنتی اکسیدان ها دانستند(۲۳). آنان در مطالعه ای که بر روی موش انجام دادند اعلام نمودند که وقتی این حیوانات در معرض دود سیگار قرار گیرند با وجودی که قادر به سنتز این ویتامین هستند، غلظت سرمی ویتامین C به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد(۲۳). ممکن است تصور شود که اسید اسکوربک افراد سیگار را در برابر تعدادی از آسیب های حاصل از رادیکال های آزاد موجود در دود سیگار و تولید شده توسط دود استنشاق شده حفظ کند(۲۳). این نتایج با پژوهش اخیر که بیشترین کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم در گروه تجویز نیکوتین بود هماهنگ می باشد. ظرفیت آنتی اکسیدانی در گروه T3 از گروه کنترل هم بیشتر شد(P=۰/۰۶).

در راستای تکمیل مطالعه ی صورت گرفته به اندازه گیری هورمون استرادیول در سرم، جهت تایید افزایش سطح استروژن و بهبود وضعیت تولید مثلی حیوان نیز پرداخته شود. هم چنین سنجش سایر فاکتورهای استرس اکسیداتیو نیز پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری

با توجه به استفاده از نیکوتین و اعمال استرس اکسیداتیو بر روی بافت‌های مختلف از جمله تخمدان و آسیب در روند فعالیت طبیعی فولیکولوژنز می‌توان به افزایش غلظت مالون دی آلدئید به عنوان یک شاخص استرس اکسیداتیو اشاره نمود. بنابراین پیشنهاد می شود عصاره ی هیدروالکلی یونجه با غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم با توجه به داشتن فیتواستروژن ها، فلاوونوئیدها و ویتامین C اثرات قابل توجهی در راستای کاهش استرس های اکسیداتیو وارد به تخمدان و احتمالا بهبود وضعیت باروری دارد.

تشکر و قدردانی

مقاله، مستخرج از پایان نامه دانشجوی دکتری عمومی دامپزشکی با کد ۱۱۰۱۰۵۰۱۹۳۲۰۲۷ دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج بوده که از معاونت پژوهشی واحد در خصوص تایید و حمایت آن تشکر می نماییم. هم چنین از آقای رضا آتشین صدف دانشجوی دکتری دامپزشکی نیز به سبب همکاری و مساعدت در انجام مطالعه تشکر و قدردانی می شود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

منابع

1. Chumnantana R, Yokochi N & Yagi T. Vitamin B6 compounds prevent the death of yeast cells due to menadoine, a reactive oxygen generator. Biochim Biophys Acta 2005; 1722(1): 84-91.

2. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S & Rezaiee A. Pestisides and oxidative stress: A review. Medicla Science Monitor 2004; 10(6): 141-7.

3. Duleba AJ. Medical management of metabolic dysfunction in pcos. Steroids 2012; 77(4): 306-11.

4. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J & Goldman M. Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. Hum Reprod Update 2008; 14(4): 345-57.

5. Liu J, Liu M, Ye X, Liu K, Huang J, Wang L, et al. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant n-acetyl-l-cysteine (nac). Human Reproduction 2012; 27(5): 1411-20.

6. Ahmad N, Akhtar S, Rahman Z, Ali M & Ahmad I. Ethanolic extract of medicago sativa exhibits estrogen- like activity, increases serum total proteins and decreases serum total cholesterol contents in immature female rats. Available at: http://www.endocrine-abstracts.org/ea/0028/ea0028P324.htm. 2013.

7. Contero F, Abdo S, Vinueza D, Moreno Tuquinga M & Paca N. Estrogenic activity of ethanolic extract from leaves ilex guayusaloes and medicagosativa in rattud norvegicus. Archives 2015; 2(1): 95-9.

8. Hughes HC. Euthanasia of laboratory animals. In: Handbook of laboratory animal science. 3rd ed. Cleveland: CRC Press; 1976: 553.

9. Lillie RD. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Co; 1965: 715.

10. Takasy S, Rashed Mohassel MH & Banayan M. Evaluation of allelopathic potential of aqueous extracts on germination and seedling growth of alfalfa shoots four weed. Journal of Iranian Field Crop Research 2011; 9(1): 59-68[Article in Persian].

11. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clinica Chimica Acta 1978; 90(1): 37-43.

12. Cerrato PL. Can plant estrogens help fight cancer? Available at: http://go.galegroup.com/ps/anony mous?id=GALE%7CA21223281&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=fulltext&issn=00337021&p=AONE&sw=w&authCount=1&isAnonymousEntry=true. 1998.

13. Tukey J. Comparing individual means in the analysis of variance. Biometrics 1949; 5(2): 99-114.

14. Balazadeh F & Hassanzadeh SH. Effects of nicotine on ovarian follicles histomorphometry histomorphological and adult rats. Journal of Qom University of Medical Sciences 2014; 8(6): 1-9[Article in Persian].

15. Helen A, Krishnakumar K, Vijayammal PL & Augusti KT. Antioxidant effect of onion oil (Allium cepa. Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. Toxicology Letters 2000; 116(1-2): 61-8.

16. Aydos K, Gueven MC, Can B & Ergue A. Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. BJU International 2001; 88(6): 622-6.

17. Verdrengh M, Collins LV & Bergin P. Phytoestrogen genistein as an antistaphylococcal agent. Microbes Infect 2004; 6(1): 86-92.

18. Choquette S, Riesco E & Cormier E. Effects of soya isoflavones and exercise on body composition and clinical risk factors of cardiovascular diseases in overweight postmenopausal women: A 6-month doubleblind controlled trial. British Journal of Nutrition 2011; 105(8): 1199-209.

19. Samari M, Rahnema M, Nasiri SH & Shahnawaz A. The effects of hydro-alcoholic extract of aerial parts of alfalfa on acetic acid-induced gastric ulcer in animal models. Journal of Animal Physiology and Development 2014; 7(2): 59-71[Article in Persian].

20. Khosravi M, Amraie E, Kavian P & Keshvar M. Effects of aqueous extract of alfalfa on hyperglycemia and dyslipidemia in alloxan-induced diabetic Wistar rats. Interventional Medicine & Applied Sciences 2016; 8(3): 103-8[Article in Persian].

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

21. Hosseini Aghoosi SM, Nabatchian F, Mordadi A & Khodaverdi F. Evaluation of effects of alfalfa extract and risk of breast cancer. Payavard Salamat 2014; 8(5): 415-26[Article in Persian].

22. Nabatchian F, Ashteeani M & Noroozi A. The effect of combined vitamin supolements compared withsingle vitamins d3, A, E in reducing oxidative stress in female mice with breast cancer. Payavard Salamat 2016; 10(2): 119-32[Article in Persian].

23. Bendich A, Mashlin LJ, Scandurra O, Burton GW & Wayner DDM. The antioxidant role of vitamin C. Advances in Free Radicals Biology and Medicine 1986; 2(2): 419-44.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]

The Effect of Different Doses of Alcoholic Extract of Alfalfa on the Control of Oxidative Stress by Nicotine in the Ovaries of Female Rats

Sistani Sajjad[1] (D.V.M.) - Raeeszadeh Mahdieh[2] (Ph.D.) - Amiri Ali Akbar[3] (Ph.D.)

1 Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
2 Assistant Professor in Pharmacology, Basic Sciences Department, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
3 Instructor in Anatomy, Basic Sciences Department, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Abstract

Received: Nov 2016
Accepted: Mar 2017

Background and Aim: Due to the importance of infertility caused by oxidative stress induced by nicotine, this study was to evaluate the effect of alfalfa extract in contrast with the nicotine on ovarian tissues in rats.

Materials and Methods: Twenty-four adult female rats were randomly divided into 4 groups. Control group received no treatment; nicotine (0.2 mg/kg) was injected to T1 subcutaneously; and nicotine plus hydroalcoholic extract of alfalfa was prescribed to T2 and T3 orally for 25 days at 250 and 500 mg/kg, respectively. On the last day, the animals were weighed. After euthanizing the animals, their ovaries were removed and weighed. Right ovary was used for MDA measure and left ovary was fixed and stained to count the primary, secondary, graafian, and atretic follicles and corpus luteum (CL).

Results: Body weight in T1 (219 gr) decreased by 10 percent, and the average compared with that of the control group, T2 and T3 was significant. The highest ovarian weight was observed in T3 group (146.66±8.94mg). In T3, the average of primary and graafian follicles and CL was higher than that of T1, but atretic follicle was lower than that of T1 group. The MDA concentration in the control group (0.35±0.01 µmol/ml) was less than that in the other groups, but the TCA in T3 (821.18±3.25 µmol/ml) was significantly more than that in T1 group (708.85±12.44).

Conclusion: The hydroalcoholic extract of alfalfa can reduce the oxidative stress caused by nicotine on ovarian tissue and probably improve fertility status.

Keywords: Hydroalcoholic Extract of Alfalfa, Nicotine, Oxidative Stress, Ovary, Female Rats

*** Corresponding Author:**
Raeeszadeh M;
Email:
mraes@iausdj.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-10-01]