

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

سجاد سیستانی<sup>۱</sup>، دکتر مهدیه رئیس زاده<sup>۲</sup>، دکتر علی اکبر امیری<sup>۳</sup>

### 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 صحرائی ماده بود.

روش بررسی: ۲۴ سر موش صحرائی 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 میلی گرم بر کیلوگرم و گروه های T2، T3 به ترتیب علاوه بر نیکوتین، عصاره ی هیدروالکلی یونجه با مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی به مدت ۲۵ روز تجویز شد. در روز آخر حیوانات وزن گیری شدند. از قلب حیوانات خون گیری و سرم برای اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیداتیو جدا شد. بعد از آسان کشی موش ها با دوز بالای تیوپنتال، تخمدان ها خارج و وزن گیری شد. تخمدان راست برای اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید، و تخمدان چپ برای شمارش فولیکول های اولیه، ثانویه، گراف، آترتیک و جسم زرد فیکس و رنگ آمیزی شد.

یافته ها: وزن حیوانات در گروه T1 (۲۱۹ گرم)، کاهش ۱۰ درصدی داشت و این میانگین با گروه کنترل، T2 و T3 معنی دار شد. بیشترین وزن تخمدان در گروه T3 (۱۴۶/۶۶±۸/۹۴) میلی گرم مشاهده شد. گروه T3 میانگین فولیکول های اولیه، گراف و جسم زرد بیشتر از گروه T1، اما آترتیک فولیکول کمتر از گروه T1 شد. غلظت مالون دی آلدئید گروه کنترل ۰/۳۵±۰/۰۱ میکرومول بر میلی لیتر از بقیه گروه ها کمتر و ظرفیت آنتی اکسیداتیو در گروه T3 ۸۲۱/۱۸±۳/۲۵ میکرومول بر میلی لیتر بیشتر از T1 ۷۰۸/۸۵±۱۲/۴۴ و معنی دار شد.

نتیجه گیری: عصاره ی هیدروالکلی یونجه می تواند استرس اکسیداتیو ناشی از نیکوتین را بر بافت تخمدان کاهش داده و وضعیت باروری را احتمالاً بهبود بخشد.

واژه های کلیدی: عصاره ی هیدروالکلی یونجه، نیکوتین، استرس اکسیداتیو، تخمدان، موش صحرائی ماده

دریافت مقاله: آذر ۱۳۹۵

پذیرش مقاله: فروردین ۱۳۹۶

\*نویسنده مسئول:

دکتر مهدیه رئیس زاده؛

دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج

Email :  
mraes@iausdj.ac.ir

<sup>۱</sup> دکتری عمومی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

<sup>۲</sup> استادیار فارماکولوژی، گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

<sup>۳</sup> مربی علوم تشریح، گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

## مقدمه

موش صحرائی ماده ی بالغ از نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت.

حیوانات در شرایط استاندارد، حرارت ۱۸-۲۰ درجه سانتی گراد و دوره شبانه روزی ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در حیوان خانه ی دانشکده دامپزشکی سندج 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 صحرائی 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 میلی گرم 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 میلی گرم 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 میلی گرم 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 حفره ی شکم باز شد، سپس تخمدان از بافت های اطراف جدا گردید. پس از جداسازی چربیها و بافت های اضافی اطراف تخمدان، تخمدان توسط ترازوی دیجیتال وزن شد. سپس بلافاصله تخمدان چپ در محلول تثبیت کننده ی فرمالین بافر ۱۰ درصد غوطه ور شد و مراحل مربوط به تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی های هماتوکسین - ائوزین انجام شد (۹).

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

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، گلوکاتایون 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 نوکلئیک، پروتئین ها، چربی ها و کربوهیدرات ها توسط رادیکال های آزاد ایجاد شده و بنابراین اثرات سایتوتوکسیک ایجاد می شود (۲).

شواهد موجود نشان می دهد 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 احتمالاً 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، فولیکولونز، تولید تخمدانی استروئیدها، لوتئولیز، تخمک گذاری، تغییرات دوره ای آندومتر و قاعدگی خواهد شد (۳ و ۴).

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 (۵ و ۴).

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، فلاونوئیدها و ویتامین های C و E احتمالاً 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 صحرائی 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 مداخله ای بر روی ۲۴ سر

محلول استاندارد مالون دی آلدئید در غلظت‌های ۰/۲-۲ 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 ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر سولفات آهن اندازه‌گیری 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 در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

براساس نتایج به دست آمده در روز بیست و ششم، بیشترین وزن موش‌ها در گروه کنترل با وزن تقریبی ۲۵۵ گرم و کمترین وزن در گروه آزمایش اول (T1) با متوسط ۲۱۹ گرم بود. اختلاف وزن موش‌ها در گروه کنترل با وزن موش‌ها در گروه آزمایش دوم ۲۲۶ گرم و معنی‌دار شد. به جز در گروه کنترل در بقیه گروه‌ها 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.

تخمندان راست برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید با روش تیوباربتوریک اسید به صورت تازه مورد استفاده قرار گرفت.

#### روش تهیه عصاره ی هیدروالکلی یونجه

برای تهیه 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 جرم‌گیری می‌کنیم. عصاره ی به دست آمده تحت خلا با روتاری تغلیط 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-آلد ریچ 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 (MDA) Malondialdehyde که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهاست استفاده شد (۱۱). به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هم‌وزن 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 تیوباربتوریک ۶۷ درصد اضافه کردیم و محلول سپس به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش گذاشته شد. سپس ۲ میلی‌لیتر PI- 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.

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

پارامترها	وزن تخمدان	فولیکول‌های اولیه	فولیکول‌های ثانویه	فولیکول‌های گراف	فولیکول‌های اترتیک	جسم زرد
گروه‌ها	میلی گرم					
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**

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

گروه کنترل: بدون تیمار

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

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

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

\*\*\*, \*\*, \* به صورت ستونی و همسان (از نظر تعداد)، نشان بر اختلاف آماری معنی دار  $P < 0.05$  بین آن دو گروه است

T1 (تجویز نیکوتین ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم) ۳/۶۶ بود. به نحوی که این اختلاف در سطح  $P < 0.05$  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 ( $P < 0.05$ ). 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.

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 میلی گرم بود. اختلاف بین وزن تخمدان بین گروه T3 با گروه T1 معنی دار شد. می توان گفت با توجه به استرس اکسیداتیو نیکوتین روند فولیکولوز 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

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

گروه	پارامترها	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  $P < 0.05$  دیده شد

گروه T3 بوده که با توجه به استفاده از عصاره ی هیدروالکلی یونجه با دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در این گروه و احتمالاً بیشترین غلظت ترکیبات فیتواستروژنیک، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات آنتی اکسیدان دیگر از جمله ویتامین C، آسب اتروفی فولیکولی ناشی از استرس اکسیداتیو نیکوتین به حداقل خود رسیده است.

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 اتروفی فولیکولها شده است در گروه T1 مشاهده شد. کمترین تعداد فولیکول اترتیک در

جدول ۳: Mean±sem ملون دی آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سر (TCA) گروه های 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

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

گروه کنترل: بدون تیمار

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

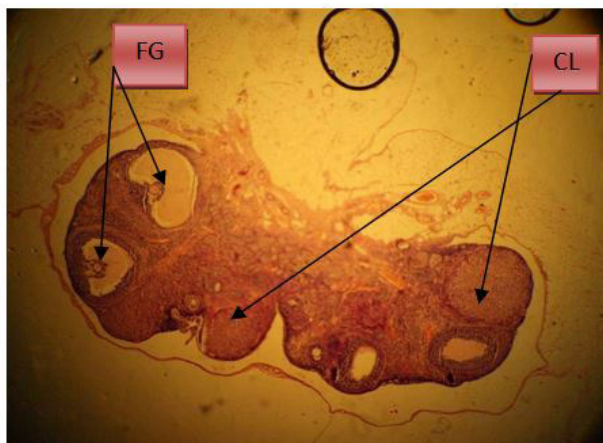
گروه T2: عصاره ی یونجه ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم و نیکوتین ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز

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

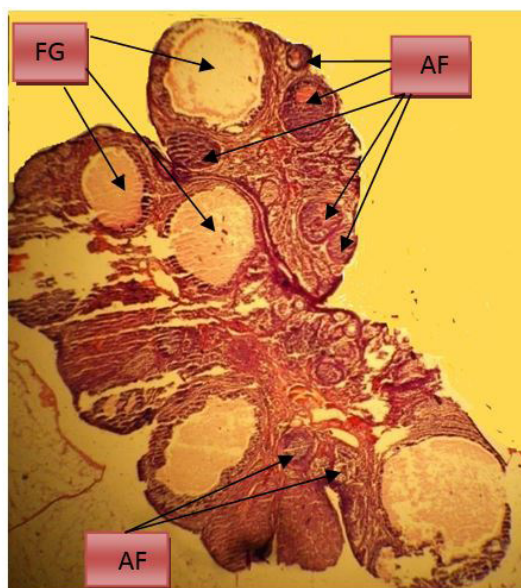
\*\*\*،\*\*\*،\*\*\* به صورت ستونی و همسان(از نظر تعداد)، نشان اختلاف آماری معنی دار  $P < ۰/۰۵$  بین آن دو گروه است

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.

بر اساس نتایج به دست آمده در جدول ۳، بیشترین میانگین غلظت مالون دی آلدئید در گروه T1 حدود ۰/۶۷ میکرومول بر میلی لیتر و کمترین در گروه کنترل با میانگین ۰/۳۵ مشاهده شد. در ارتباط با ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم بیشترین میزان در گروه T3 با

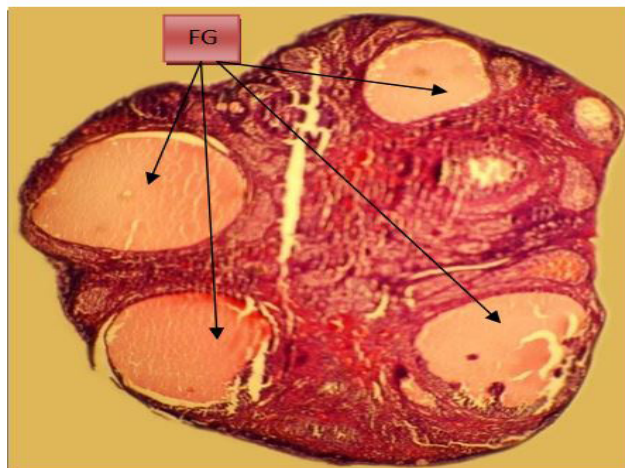


شکل ۱: نمای میکروسکوپی تفسمان با بزرگنمایی ۴۰ در موش‌های گروه کنترل، رنگ آمیزی هماتوکسیلین\_اِئوزین، فولیکول گراف (FG) جسم زرد (CL)

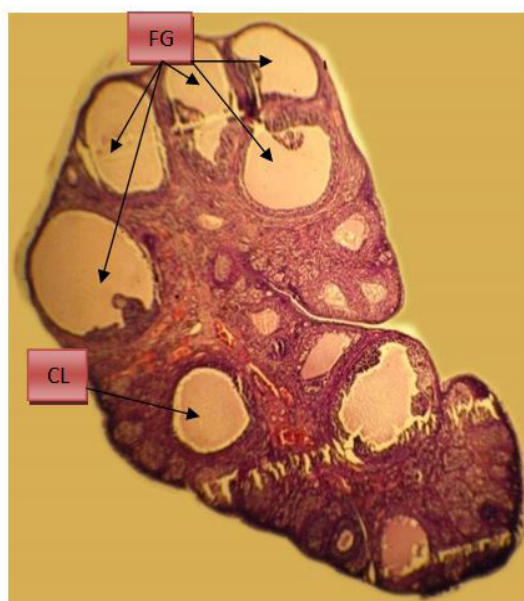


شکل ۲: نمای میکروسکوپی تفسمان با بزرگنمایی ۴۰ در موش‌های گروه T1، رنگ آمیزی هماتوکسیلین\_اِئوزین، فولیکول گراف (FG) فولیکول آتریک (AF)





شکل ۳: نمای میکروسکوپی تخمدان با بزرگنمایی ۴۰ در موش‌های 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)

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 تیره ی بقولات، سرشار از ویتامین‌های A، C، E، K و دارای ترکیبات فلاونوئیدی، فلاون ها و ایزوفلاون ها. از ایزوفلاون‌ها 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، فلاونوئیدی و ویتامین C موجود در عصاره هیدروالکلی یونجه که سبب تسریع بهبود زخم ناشی از اسید استیک در معده ی موش صحرائی شده بود نیز اشاره کرده اند (۱۹).

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 بر روی 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

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 می یابد (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 ( $P=0/06$ ).

در راستای تکمیل مطالعه ی صورت گرفته به اندازه گیری هورمون استرادیول در سرم، جهت تایید افزایش سطح استروژن و بهبود وضعیت تولید مثل 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 بافت های مختلف از جمله تخمدان و آسیب در روند فعالیت طبیعی فولیکولوزن می توان 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، فلاونوئیدها و ویتامین C اثرات قابل توجهی در راستای کاهش استرس های اکسیداتیو وارد به تخمدان و احتمالاً 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 نمایم. هم چنین از آقای رضا آتشین صدف دانشجوی دکتری دامپزشکی نیز به سبب همکاری و مساعدت در انجام مطالعه تشکر و قدردانی می شود.

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 مخصوصاً 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، فلاونوئیدها و ایزوفلاون 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

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. Pesticides 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 guayusaloos and medicagosativa in rattud norvegicus. *Archives* 2015; 2(1): 95-9.
8. Hughes HC. Euthanasia of laboratory animals. In: *Handbook of laboratory animal science*. 3<sup>rd</sup> ed. Cleveland: CRC Press; 1976: 553.
9. Lillie RD. *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3<sup>rd</sup> 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/anonymouse?i=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].



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 suplements compared with single 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.

# 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<sup>1</sup> (D.V.M.) - Raeeszadeh Mahdieh<sup>2</sup> (Ph.D.) - Amiri Ali Akbar<sup>3</sup> (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