مقاله پژوهشی

اثر فیتواستروژنیک عصاره‌ی هیدروالکلی یونجه بر استرس اکسیداتیو و تشکیل فولیکول در موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار

سجاد سیستانی[1]، مهدیه رئیس زاده[2*]، علی اکبر امیری[2]

۱. واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
۲. گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۴/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: امروزه مشکلات ناباروری ازجمله عدم تشکیل فولیکول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هدف از این پژوهش تأثیر عصاره هیدروالکلی یونجه بر استرس اکسیداتیو و بافت تخمدان در موش صحرایی ماده بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه از نوع تجربی-مداخله‌ای بر روی ۲۴ سر موش صحرایی نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه کنترل (بدون تیمار) و عصاره هیدروالکلی یونجه در دوزهای ۲۵ (آزمایش ۱) و ۵۰ (آزمایش ۲) میلی‌گرم بر کیلوگرم تقسیم شدند و عصاره به مدت ۲۵ روز داخل صفاقی تزریق شد. در پایان وزن حیوانات و وزن تخمدان اندازه‌گیری گردید. تخمدان چپ برای بررسی سلول‌شناسی تثبیت و رنگ‌آمیزی شد. هم‌چنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در سرم و غلظت مالون‌دی‌آلدئید در بافت تخمدان راست اندازه‌گیری شد.

نتایج: در پایان آزمایش وزن موش‌ها در گروه‌های کنترل و آزمایش نسبت به قبل از آزمایش افزایش یافت اما معنی‌دار نبود. بیشترین وزن تخمدان در آزمایش ۲ (۱۶۰ میلی‌گرم) و کمترین در گروه کنترل (۱۴۶ میلی‌گرم) دیده شد ($P>0/05$). فولیکول‌های اولیه، ثانویه و جسم زرد بیشترین تعداد در گروه آزمایش ۲ و کمترین در گروه کنترل بود. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در گروه آزمایش ۱ و ۲ به ترتیب حدود ۹۲۲ و ۹۳۷ و کمترین در گروه کنترل ۷۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر بوده و این اختلاف در هر دو گروه آزمایش با کنترل معنی‌دار شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید در گروه کنترل با متوسط ۰/۳۵ و در آزمایش ۲، ۰/۲۲ میکرومول بر میلی‌لیتر به دست آمد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی یونجه با اثرات فیتواستروژنیک و کنترل استرس‌اکسیداتیو سبب تقویت فعالیت تخمدان در موش صحرایی بالغ می‌شود.

کلمات کلیدی: عصاره هیدروالکلی یونجه، تخمدان، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی

مقدمه

امروزه، رشد جمعیت و درمان ناباروری، به‌ویژه درکشورهای درحال‌توسعه از اهمیت بالایی برخورداراست (۱)؛ که آمارها نشان می‌دهد مشکل ناباروری از سال ۱۹۹۰ شروع و در دو دهه اخیر مشکل ناباروری در کشورهای درحال‌توسعه مخصوصاً در مناطق آفریقا و جنوب آسیا رو به افزایش است (۲، ۳). فاکتورهای مختلف ازجمله عفونت‌ها، ژنتیک، محیط، تغذیه و اجتماع بر ناباروری مؤثر است به‌نحوی‌که این فاکتورها می‌تواند بر زن یا مرد یا هر دو مؤثر باشد (۳). امروزه مشکلات ناباروری ازجمله عدم تشکیل فولیکول با ترکیبات مختلف محرک فولیکول، ترکیبات ضداستروژنیک مانند داروی کلومیفن، تاموکسیفن و گنادوتروپین‌ها مانند هورمون FSH و LH مورد درمان واقع شده است (۴، ۵).

داروهای جدید باوجود امتیازهای ظاهری نسبت به طب سنتی در طولانی‌مدت همراه با عوارض جانبی بوده که شاید از خود بیماری خطرناک‌تر شود (۱).

امروزه استفاده از ترکیبات گیاهی در درمان ناباروری مورد توجه واقع شده است (۶). ازجمله این ترکیبات استروژن‌های گیاهی (فیتواستروژن) می‌باشند. این ترکیبات که به لحاظ

*نویسنده مسئول: مهدیه رئیس زاده، گروه علوم پایه، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج،ایران
E-mail: vet_mr@yahoo.com

ساختمانی و عملکردی مشابه ۱۷ بتا استرادیول است در جریان خون به گیرنده‌های استروژنی متصل می‌شود. این اتصال در مقایسه با استروژن آندروژن بدن، کمتر است. درهرحال این ترکیبات قادر به تولید اثرات استروژنی است (۷). فیتواستروژن‌ها شامل فلاوونوئیدها، ایزوفلاوون‌ها، کومستان، لیگنان و آنتراکوئینون است.

ایزوفلاون‌ها بیش از دیگر فیتواستروژن‌ها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و دارای خواصی شبیه استروژن در پستانداران می‌باشند (۸، ۹). ایزوفلاون‌ها به مقادیر زیاد در سویا و فرآورده‌های آن و همچنین در گیاه یونجه(*MEDICAGOSATIVA*) یافت می‌شود.

ایزوفلاون‌های گیاه یونجه شامل جنیستئین، تریسین، فرمونونتین، دیادزئین، متوکسی ساتیوان و مشتقات کومارین، کومسترول، مدیکاگل، تری فولیول، ساتیول، دافنورتین و لوسرنول و پکتین متیل استراز است (۱۰).

نقش ایزوفلاون‌ها در کنترل و درمان سرطان مخصوصاً سرطان‌های مربوط به غدد درون‌ریز مانند سرطان سینه مشخص شده است؛ اما اینکه این‌ها به‌عنوان ضداستروژن عمل می‌کنند یا هم گام با آن نظرات ضدونقیضی مطرح است (۱۱). علاوه براین فیتواستروژن‌ها در نقش آنتی‌اکسیدان نیز می‌توانند فعالیت نموده و بدن را از تأثیر مخرب رادیکال‌های آزاد محافظت کنند. همچنین تأثیر ضد تکثیری بر سلول‌های سرطانی دارند و از رشد تومور جلوگیری می‌کنند. با درنظرگرفتن اینکه یونجه یکی از ترکیبات گیاهی مفید، مناسب و در دسترس است و با توجه به پتانسیل‌های فیتواستروژنیک و آنتی‌اکسیدانی آن، بررسی تأثیر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی آن بر ساختمان تخمدان موش صحرایی ازجمله اهداف این پژوهش بود.

مواد و روش ها

تحقیق از نوع مطالعات تجربی- مداخله‌ای بر روی ۲۴ سر موش‌های صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام گرفت. حیوانات در شرایط استاندارد درجه حرارت ۲۰-۱۸ درجه و پریود شبانه‌روزی ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در حیوان خانه دانشکده نگه‌داری شدند. آب و غذا در طول دوره آزمایش بدون محدودیتی در اختیار حیوانات قرار گرفت.

سعی گردید در طول مدت انجام آزمایش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردد. موش‌ها قبل و بعد از آزمایش وزن گیری شدند. طول دوره آزمایش ۲۵ روز یعنی درواقع معادل سپری شدن ۵ سیکل جنسی (استروس) در رت بود (۱۲).

کلیه رت‌ها به‌صورت تصادفی در ۳ گروه جداگانه و در هر گروه ۸ سر تقسیم‌بندی شده که گروه‌بندی به‌صورت زیر بود:

گروه کنترل: بدون تیمار با عصاره و دریافت آب و غذای استاندارد

گروه آزمایش ۱: عصاره هیدروالکلی یونجه ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی به مدت ۲۵ روز

گروه آزمایش ۲: عصاره هیدروالکلی یونجه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی ۲۵ روز (۱۲).

در روز آخر پژوهش قبل از معدوم‌سازی، با توجه به اهمیت هم سیکل بودن موش‌ها در زمان تهیه نمونه‌های بافتی، با تهیه اسمیری از واژن و رنگ‌آمیزی گیمسا به بررسی سلول‌های آن پرداخته شد؛ و مشاهده شد اکثر حیوانات مورد آزمایش در سیکل دی استروس (لکوسیت فراوان و فاقد سلول‌های شاخی) بودند. چهار سر از موش‌ها با تعویق یک یا دو روز جهت هم‌زمانی سیکلی معدوم‌سازی و نمونه‌گیری شد.

از قلب موش‌ها قبل از معدوم‌سازی به روش انسانی (اوردوز تیوپنتال سدیم داخل صفاقی) خون‌گیری انجام شده و سپس با سانتریفیوژ دور g ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سرم برای اندازه‌گیری غلظت آنتی‌اکسیدانی جداسازی شد.

جهت برداشت تخمدان، ابتدا حفره‌ی شکم باز شد. سپس تخمدان جدا گردید و پس از جداسازی چربی‌ها و بافت‌های اضافی اطراف آن، توسط ترازوی دیجیتال وزن گردید. سپس بلافاصله تخمدان چپ در محلول تثبیت‌کننده‌ی فرمالین ۱۰ درصد غوطه‌ور شد و بعد از فیکس شدن به مدت ۷ روز و انجام مراحل رایج پاساژ بافتی و تهیه‌ی مقاطع آسیب‌شناسی، برش‌های ۵ میکرونی تهیه و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد. شمارش فولیکول‌های اولیه، ثانویه، گراف، اترتیک و جسم زرد با میکروسکوپ نوری انجام شد. برای جلوگیری از هرگونه اشتباه در شمارش، ابتدا یک فولیکول انتخاب و سایر فولیکول‌ها در جهت عقربه‌های ساعت شمارش شدند. این کار در سه فیلد میکروسکوپ انجام و سپس میانگین گرفته شد. تخمدان راست برای اندازه‌گیری غلظت مالون دی آلدئید (MDA) به صورت تازه مورد استفاده واقع شد.

برای تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه یونجه، ابتدا گیاه یونجه (*medicago sativa*) در فروردین‌ماه از مناطق خوزستان

تهیه‌شده بعد از تائید مرکز هرباریوم دانشگاه کردستان، در جای خنک و به‌دوراز نور، خشک‌شده و به‌صورت پودر درآمد. سپس ۱۵۰ گرم از پودر خشک با اتانول ۷۵ درصد به حجم یک لیتر رسانیده به مدت ۴۸ ساعت با روش غوطه‌ورسازی (ماسیراسیون)، صاف شده و سپس با سانتریفیوژ ۲۵۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه کاملاً جرم‌گیری شد. عصاره به‌دست‌آمده تحت خلأ با روتاری تغلیظ و خشک گردید. سپس با کمک سدیم کلراید ۰/۹ درصد محلول سازی شده و دوزهای مختلف بر اساس وزن حیوان محاسبه و تزریق صفاقی شد (۱۳).

از بافت تخمدان راست برای تعیین سنجش میزان MDA که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهاست با روش تیوباربیتوریک اسید (TBA) استفاده شد. 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 و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش گذاشته سپس ۲ میلی‌لیتر ان-بوتانول به آن اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفیوژ و سپس جذب محلول رویی صورتی‌رنگ را در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱ و ۱ و ۳ و ۳ تتراتوکسی پروپان به‌عنوان استاندارد تعیین گردید محلول استاندارد مالون دی آلدئید در غلظت‌های ۲-۰/۲ میکرومولاردر اسیدسولفوریک ۱ درصد تهیه شد. غلظت مالون دی آلدئید برحسب میکرومول بر لیتر محاسبه شد (۱۴).

برای سنجش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی سرم (TCA) از روش ارائه‌شده توسط بنزی و همکاران به نام روش FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) استفاده شد (۱۵). اصول کار در این روش، توانایی سرم در احیای یون فریک است. در pH اسیدی، زمانی که کمپلکس FeIII-TPTZ به FeII احیا می‌گردد تولید رنگ آبی نموده که در طول‌موج ۵۹۳ بیشترین جذب نوری را دارد. مقادیر TCA با استفاده از نمودار استاندارد غلظت ۱۰۰۰-۱۰۰ میکرومول بر لیتر سولفات آهن اندازه‌گیری می‌شود (۱۵).

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد ارائه شد. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و تست تعقیبی توکی (Tukey) استفاده گردید. سنجش آماری داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS 21انجام و P<0.05 سطح معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

در ارتباط با میانگین وزن حیوانات گروه کنترل و گروه‌های آزمایش ۱ و ۲ در پایان دوره افزایش وزن را نشان داده که این اختلاف با قبل از آزمایش معنی‌دار نبود. میانگین وزن گروه کنترل در روز آخر ۲۵۵ گرم و در روز اول ۲۳۸ گرم بود. در گروه آزمایش ۱ متوسط وزن در روز آخر ۲۴۸ گرم و در روز اول ۲۳۵ گرم و در گروه آزمایش ۲ در روز آخر ۲۴۲ گرم و در روز اول ۲۳۶ گرم بود. اختلاف آماری معنی‌داری بین وزن موش‌ها در روز

جدول۱- میانگین ± انحراف استاندارد تخمدان و انواع فولیکول‌های سطح تخمدان در گروه‌های مختلف آزمایش

پارامترها / گروه‌ها	وزن تخمدان میلی‌گرم	فولیکول‌های اولیه	فولیکول‌های ثانویه	فولیکول‌های گراف	فولیکول‌های اتریک	جسم زرد
گروه کنترل	۱۴۶/۶۶±۸/۰۲	۴/۵±۰/۲۲ [a]	۲/۸۳±۰/۳۰ [a]	۵/۱۶±۰/۱۶	۳/۱۶±۰/۲۶	۲/۱۶±۰/۰۶ [a]
گروه آزمایش ۱	۱۴۱/۶۷±۱۲/۲۲	۵/۸۳±۰/۳	۳/۳۳±۰/۴۹	۴/۰۰±۰/۶۳	۳/۱۷±۰/۱۶	۲/۶۱±۰/۱۶ [c]
گروه آزمایش ۲	۱۶۰±۱۴/۳۱	۷/۵±۰/۸۴ [a]	۵/۱۶±۰/۹۴ [a]	۵/۱۳±۰/۳۳	۲/۳۳±۰/۲۱	۴/۶۶±۰/۴ [c,a]

گروه کنترل: بدون تیمار با عصاره
گروه آزمایش ۱: دریافت عصاره یونجه ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز
گروه آزمایش ۲: دریافت عصاره یونجه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز
حروف مشابه لاتین به‌صورت ستونی در گروه‌ها نشان بر اختلاف آماری معنی‌دار (P<0.05) است.

جدول۲- میانگین±انحراف استاندارد مالون دی آلدئید و ظرفیت انتی اکسیدانی سرم در گروه‌های مختلف آزمایش

گروه	MDAµmol/L	TCAµmol/ml
گروه کنترل	۰/۳۵±۰/۰۱۱[a]	[a,b]۳۴/۸۶±۷۸۰/۶۶
گروه آزمایش ۱	۰/۳۱±۰/۰۲۰	[a]۹۲۲/۱۸±۱۶/۴۱
گروه آزمایش ۲	۰/۲۲±۰/۰۰۳[a]	[b]۹۳۷/۰۳±۱/۴۹

گروه کنترل: بدون تیمار عصاره
گروه آزمایش ۱: دریافت عصاره یونجه ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز
گروه آزمایش ۲: دریافت عصاره یونجه ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲۵ روز
حروف مشابه لاتین به‌صورت ستونی در گروه‌ها نشان بر اختلاف آماری معنی‌دار (P<0.05) است.

اول و آخر پژوهش بین گروه‌ها دیده نشد (P>۰/۰۵).در جدول ۱ به بررسی میانگین وزن تخمدان چپ و راست که اطلاعات مناسبی در ارتباط با وضعیت سلول‌های سطح آن خواهد داد، در گروه‌های مختلف پرداخته شد. بر اساس این جدول بیشترین وزن تخمدان در گروه T2 با وزن حدود ۱۶۰ میلی‌گرم مشاهده شد. وزن تخمدان در گروه کنترل ۱۴۶ میلی‌گرم و در گروهِ آزمایش ۱ کمترین وزن تخمدان با وزن ۱۴۱ میلی‌گرم مشاهده شد.

فولیکول‌های اولیه در گروه آزمایش ۲ با میانگین ۷/۵ و در گروه کنترل با میانگین ۴/۵ به دست آمد. هم‌چنین میانگین تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های آزمایش ۲، ۱ و کنترل به ترتیب به ترتیب ۵/۱، ۳/۳، ۲/۸ شد به‌نحوی‌که به ترتیب بیشترین در گروه آزمایش ۲ و کمترین در گروه کنترل دیده شد. اختلاف دیده‌شده در فولیکول‌های اولیه بین گروه کنترل و آزمایش ۲ غیر معنی‌دار اما در فولیکول‌های ثانویه معنی‌دار شد (P<۰/۰۵).

در ارتباط با فولیکول‌های گراف (بالغ) بیشترین تعداد در گروه کنترل با میانگین ۵/۱ و کمترین در گروه آزمایش ۱ با میانگین ۴ وجود داشت. اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌ها در تعداد فولیکول گراف مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

در ارتباط با میانگین فولیکول‌های آترتیک به ترتیب در گروه‌های کنترل، آزمایش ۱ و آزمایش ۲ به ترتیب شامل ۳/۱، ۳/۱ و ۲/۳ بوده که بیشترین تعداد فولیکول آتریک در گروه آزمایش ۱ و کنترل با هم برابر و میانگین کمتری نسبت به گروه آزمایش ۲ نشان داد.

در ارتباط با جسم زرد میانگین تعداد به ترتیب در گروه آزمایش ۲ برابر با ۴/۶، بیشترین و گروه کنترل و آزمایش ۱ برابر با ۲/۱، کمترین تعداد را نشان داد. اختلاف آماری معنی‌داری بین آزمایش ۲ در تعداد جسم زرد با گروه کنترل و گروه آزمایش ۱ مشاهده نشد.

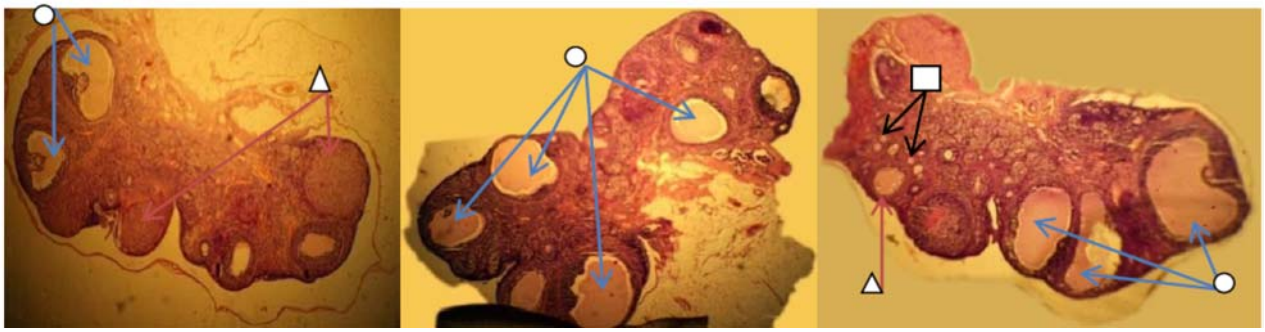
در جدول ۲ تغییرات مالون دی آلدئید در بافت تخمدان که شاخص استرس اکسیداتیو و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در سرم بوده بیان شده است. میزان مالون دی آلدئید در گروه آزمایش دوم ۰/۲۲ میکرومول بر لیتر کمترین میزان بوده به‌نحوی‌که در گروه کنترل ۰/۳۵ میکرومول بر لیتر بوده و این اختلاف در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار شد. در ارتباط با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در آزمایش ۲ حدود ۹۳۷ میکرومول بر میلی‌لیتر و در گروه کنترل ۷۸۰ میکرومول بر میلی‌لیتر بود. اختلاف بین گروه کنترل با گروه‌های آزمایش ۱ و ۲ هر دو معنی‌دار شد (P<۰/۰۵).

در مطالعه هیستولوژی بافت تخمدان انواع فولیکول‌های اولیه، ثانویه، گراف، اترتیک و جسم زرد مورد شمارش و مقایسه قرار گرفت. بر اساس شکل ۱، نمایی از برش عرضی مقاطع تخمدانی را در گروه‌های مورد آزمایش و انواع فولیکول‌های مورد بررسی و مقایسه را نشان می‌دهد.

بحث

یکی از مهم‌ترین مشکلات جوامع امروز ناباروری است که با استفاده از طب مکمل به‌جای طب مدرن می‌توان تا حدودی با کاهش عوارض جانبی به درمان پرداخت (۱۶).

یکی از ترکیبات مناسب عصاره‌های گیاهی است که دارای پتانسیل‌های مناسبی از ترکیبات آنتی‌اکسیدان است. عصاره یونجه با توانایی فیتواستروژنیک خود در غلظت‌های مناسب می‌تواند سبب تحریک فعالیت تخمدان در موش صحرایی گردد. با توجه به وجود فیتواستروژن‌های عصاره یونجه و وجود ویتامین C می‌تواند در راستای تقویت فولیکوژنز و حمایت و پیشگیری از



شکل۱- نمای میکروسکوپی تخمدان از سمت چپ با راست به ترتیب در گروه‌های کنترل، آزمایش ۱ و آزمایش ۲ با بزرگنمایی ۴۰ و رنگ‌آمیزی هماتوکسین-ائوزین(فلش‌های آبی‌رنگ نشان بر فولیکول‌های گراف، فلش قرمز جسم زرد فلش مشکی فولیکول‌های اولیه را نشان می‌دهد.)

آسیب آن توسط رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو مؤثر واقع شود.

یونجه دارای منابع خوب فیتواستروژن‌ها نظیر جنیستین و کومسترول است. در آمریکای شمالی به‌عنوان مدر، درمان بیماری کلیه، ریه و تاول در نظر گرفته می‌شود (۱۷).

در مادیان استفاده از مقادیر بالای یونجه می‌تواند سبب ایجاد سندروم هیپراستروژنیسیتی شود (۱۸). در پژوهش دیگری که توسط Ferreira-Dias و همکاران در سال ۲۰۱۳ در خصوص تأثیر کومسترول به‌عنوان فیتواستروژن گیاه یونجه در مادیان انجام شد استفاده از یونجه را در جیره غذایی مادیان سبب به‌هم‌ریختگی هورمونی و ناباروری گزارش دادند (۱۹). با توجه به نتایج مطالعه اخیر این مسئله در موش صحرایی و تجویز عصاره هیدروالکلی تزریقی یونجه متفاوت به نظر رسید.

استفاده از عصاره اتانولی یونجه در موش صحرایی ماده نابالغ را سبب افزایش غلظت پروژسترون سرم و هم‌چنین افزایش وزن تخمدان دانستند. حداکثر غلظت هورمون LH و وارد شدن به فاز استروس در زمان تجویز یونجه در میش نیز مشاهده شده است (۲۰).

در خصوص میانگین وزنی تخمدان در گروه دریافت عصاره ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم نسبت به گروه کنترل افزایش را نشان می‌دهد. این اختلاف وزن احتمالی دیده شده بین گروه عصاره ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل می‌تواند حاکی از وجود پتانسیل فیتواستروژنیک یونجه، تحریک روند فولیکولوژنز، افزایش فولیکول‌های اولیه و ثانویه نسبت به گروه کنترل دانست. دراین‌ارتباط طی پژوهشی که آغوزی و همکاران در سال ۹۳ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که ایزوفلاوون‌های یونجه با خاصیت فیتواستروژنیک می‌توانند بر روی میزان استرادیول و پروفایل لیپید در موش‌های مبتلا به سرطان پستان تاثیرگذاشته و سبب بهبود شرایط بیماری شوند (۲۱).

نتایج تغییرات سلولی بافت تخمدان در پژوهش اخیر نشان داد که بیشترین تعداد فولیکول اولیه، ثانویه در گروه آزمایش ۲ بود. به‌نحوی‌که عصاره یونجه در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانسته است حداکثر پتانسیل استرادیول گیاهی را نشان دهد به‌نحوی‌که با تحریک گیرنده‌های بتااسترادیول سبب عملکرد استروژن در بدن موش صحرایی شده است.

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده عصاره هیدروالکلی یونجه در دوز ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم اثرات مثبت بر روند فولیکولوژنز دارد به‌نحوی‌که تعداد فولیکول اولیه و ثانویه، گراف و جسم زرد را افزایش داده و از تعداد فولیکول‌های اترتیک کاسته شده است. این مسئله می‌تواند به سبب وجود ایزوفلاوون، فلاوونوئیدها و ویتامین C در عصاره یونجه باشد به‌نحوی‌که حتی شرایط را نسبت به گروه کنترل نیز ازنظر کاهش فولیکول‌های اترتیک با کنترل استرس‌های اکسیداتیو محیطی بهبود بخشیده است. به‌نحوی‌که علاوه بر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطان می‌توان به پتانسیل این گیاه در تقویت فعالیت دستگاه تناسلی ماده نیز توجه کرد.

مطالعات نشان می‌دهند که اثرات بیولوژیکی ایزوفلاوون‌ها بستگی به منبع آن‌ها دارد. مثلاً در ارتباط با گیاه Cohosh این فیتواستروژن‌ها پتانسیل ضعیفی را نشان داد درحالی‌که در ارتباط با شبدر قرمز دارای اثرات بیولوژیک مفیدی بود. بر اساس مطالعه قبلی آغوزی و پژوهش اخیر در ارتباط با یونجه نیز این مسئله را تائید نمود.

در تحقیقات قبلی به تأثیر فلاوونوئیدها به‌عنوان ترکیبات القاکننده اثرات استروژنیک اشاره شده است (۲۲، ۲۳).

به‌نحوی‌که عصاره یونجه نیز غنی از فلاوونوئیدها بوده و می‌تواند در تقویت اثرات استروژنیک و هم‌چنین کنترل فرایندهای استرس اکسیداتیو در دوزهای مناسب مفید واقع شود (۲۲).

پروین جهرمی و همکاران در پژوهش خود اعلام نمودند که دانه سویا منبع غنی فیتواستروژن‌ها مانند یونجه است که خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و استروژنیک دارند. این پژوهش جهت بررسی تأثیر عصاره‌ی هیدروالکلی سویا بر بافت تخمدان با تأکید بر اثرات هیستوپاتولوژیک و استریولوژیک انجام گرفت. نتایج نشان داد که کاهش درصد فولیکول‌های آترتیک و افزایش فولیکول‌های آنترال نشانگر تأثیرات مثبت استروژن گیاهی بر بافت تخمدان است، به نظرمی‌رسد با توجه به اثرات مثبت سویا بر بسیاری از سیستم‌های بدن استفاده آن در غلظت‌های متعادل اختلالی در روند تولیدمثل جنس ماده ایجاد نمی‌کند (۱۲).

در مطالعه‌ای که Contro و همکاران در سال ۲۰۱۵ در خصوص بررسی تأثیر فعالیت استروژنیک گیاهان *MEDICAGOSATIVA* و *GUAYUSA*LOES در موش صحرایی انجام دادند نتایج نشان داد که در غلظت‌های ۹، ۱۸ و ۳۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم یونجه باعث افزایش سطح استرادیول سرم و به‌تبع افزایش وزن تخمدان و رحم در موش صحرایی شد که ارتباط مستقیم بین وزن تخمدان و رحم با دوز مورد استفاده گزارش شد. به‌نحوی‌که عصاره هیدروالکلی یونجه می‌تواند سبب افزایش سطح استرادیول و به‌تبع افزایش اندام‌های جنسی رحم و تخمدان شود (۲۴).

مطالعه اخیر به بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی در دوزهای موردنظر مطالعه Contro بر تغییرات فولیکولی سطح تخمدان پرداخته شد. با توجه به پتانسیل‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره این مسئله با اندازه‌گیری فاکتورهای استرس اکسیداتیو هماهنگ گردید تا علت تغییرات تا حدودی واضح‌تر شود. در نتایج حاصل از مطالعه Contro به تغییرات وابسته به دوز عصاره هیدروالکلی یونجه با وزن تخمدان، رحم و غلظت استرادیول سرم گزارش شده است. در ادامه مطالعه مربوطه، این تأثیرات با افزایش دوز تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و به‌تبع غلظت‌های کمتر آن ۲۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر فولیکوژنز تخمدان بررسی گردید. به‌نحوی‌که نتایج به‌دست‌آمده حاکی از اثرات مثبت در دوزهای بالاتر از ۳۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم تا حدود ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود؛ و در این مطالعه تأثیرات وابسته به دوز عصاره تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر بافت تخمدان مورد تائید است. البته در خصوص دوزهای بیشتر و اثرات مثبت و منفی تخمدانی عصاره نیازمند مطالعات بیشتر است تا حداکثر دوز مربوط به افزایش شاخص‌های تولیدمثلی و یا بالعکس مسائل مربوط به پلی سیستیک شدن تخمدانی به‌عنوان اثرات منفی بررسی کامل و جامع گردد. در این مطالعه تغییرات هیستولوژی بافت تخمدان موش صحرایی در تجویز عصاره هیدروالکلی یونجه پرداخته شد و یکی از علل احتمالی را به توانایی‌های فیتواستروژن‌ها در کنترل استرس اکسیداتیو و القای فولیکوژنز نسبت داده است.

بر اساس پژوهش اخیر تأثیر عصاره یونجه در دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب تقویت فعالیت تخمدان در موش صحرایی شده به‌نحوی‌که با افزایش فولیکول‌های اولیه و ثانویه و جسم زرد و کاهش تعداد فولیکول‌های اترتیک باعث افزایش وزن تخمدان شده است. این اثرات با توجه به کاهش معنی‌دار مالون دی آلدئید و افزایش غلظت آنتی‌اکسیدانی سرم به جهت غلظت بالای فلاوونوئیدها و تأثیرات استروژنیک و هم‌چنین با توجه به پژوهش‌های قبلی به سبب پتانسیل‌های فیتواستروژنیک و ترکیبات ایزوفلاوون‌های فعال یونجه نیز هست.

با توجه به اهمیت غلظت فیتواستروژن‌ها و فلاوونوئیدها می‌توان با انجام پژوهش‌های گسترده‌تر و کامل‌تر با توجه به اثرات فارماکولوژیک عصاره یونجه در درمان ناباروری‌های ناشی از کمبود استروژن و شرایط آسیب‌های استرس اکسیداتیو در دوز مناسب استفاده نمود.

نتیجه گیری

عصاره هیدروالکلی یونجه در دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با خواص فیتواستروژنیک سبب تقویت فولیکولوژنز و افزایش وزن تخمدان در موش صحرایی بالغ ماده شد. به‌نحوی‌که تعداد فولیکول اولیه، ثانویه و جسم زرد نسبت به گروه کنترل بیشتر شده و در عوض تعداد فولیکول اتریک به حداقل رسیده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج با کد ۱۱۰۱۰۵۰۱۹۳۲۰۲۷ بوده که با تائید و حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد واحد سنندج انجام شد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Kooti W, Ghasemiboroon M, Ahangarpoor A, Hardani A, Amirzargar A, Asadi M, et al. The effect of hydro-alcoholic extract of celery on male rats in fertility control and sex ratio of rat offspring. J Babol Univ Med Sci. 2014;16(4):43-9 [Article in Persian]
2. Rutstein S, Shah L. Infecundity, and childlessness in developing countries. DHS comparative reports. 2004; 9(1): 53-54.
3. Mascarenhas M. N. Flaxman S.R, Boerma T, et al. Regional, and global Trends in infertility prevalence since 1990: A Systematic Analysis of 277 health surveys. PLOS med. 2012; 9(12): 1-11.
4. Balen A. Ovulation induction in the management of anovulatory polycystic ovary syndrome. Mol Cell endocrinol. 2013 5; 373(1-2): 77-82.
5. Fishel S, Jackson P. Follicular stimulation for high tech pregnancies: are we playing it safe?Bri Med J. 1989; 299(6694): 309–311.
6. Clark N.A,Will M.B, Fisseha S. A systematic review of the evidence for complementary and altenative medicine in infertility. Int J Gynecol Obstet. 2013; 122(3): 202-206.
7. Mazur W.M, Duke J.A, Wahala K, et al. Isoflavonoids and lignans in legumes:nutritional and health aspects in humans. J Nutr Biochem. 1998; 6(18): 193-200.
8. Ferreira-dias G, Botelho M, Zagrajczuk A, et al. Coumestrol and its metabolite in mares, plasma after ingestion of phytoestrogen-rich plants: potent endocrine disrupt ors inducing infertility. Theriogenology. 2013; 80(6): 648-692.
9. Rezaie A H, Razi M, Amniattalab A, Malekinejad H, Molavi M. Co-Administration of vitamin E and testosterone attenuates the atrazine-induced toxic effects on sperm quality and testes in rats. Cell J. 2017;19(2):292-305.
10. Adlercreutz H & Mazur W. Phyto-oestrogens and western diseases. Ann Med. 1997; 29 (2): 95-120.
11. Hall WL, Hallun J, Bugel S, Zunft HJ, Ferrari M, Dadd T, et al. Soy-isoflavone-eniched foods and markers of lipid and glucose metabolism in postmenopausal women: Interactions with genotype and equol production. AM J Clin Nutr. 2006; 83 (3): 592-600.
12. Parvin Jahromy, Sh. Zahir, Sh, Mahjour A.A. Histopathological and stereological studies of hydroalcoholic soybean extract effects in rat ovary. Medical Persian Gulf. 2012; 3 (15): 161-170 [Article in Persian].
13. 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): 60-9[Article in Persian].
14. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. Clin Chim Acta. 1978(90): 37-43.
15. Cerrato PL. Can plant estrogens help fight cancer? RN. J. 1998; 61 (10): 59-60.
16. Heidarifar R, Mehran N, Momenian S, Mousavi SM, Kouhbor M, HajialiGol A. A Study of the status of use of drug plants and its related factors in Qom City, Iran. Qom Univ Med Sci J. 2013;7(4):95-100. [Article in Persian].
17. Macia M, Garcia E, Jai Vidaurre P. An ethnobotanical survey of,edicinal plants commercialized in,arkets of La Paz and EL Alto, Bolivia. J Ethnopharmacol. 2005; 97(2): 337-350.
18. Ahmad N, Rahman Z, Akhtar N et al. Effect of madicago sativa on some serum biochemical metabolites in rats. Int J AgricBiol. 2013; 15(2):297-300.
19. Ferreira-Dias G1, Botelho M, Zagrajczuk A, Rebordão MR, Galvão AM, Bravo PP,et al. Coumestrol and its metabolite in mares' plasma after ingestion of phytoestrogen-rich plants: potent endocrine disruptors inducing infertility. Theriogenology. 2013 1;80(6):684-92.
20. Hettle J.AA, Kitts W.D. Effects of phyto-estrogenic alfalfa consumption on plasma LH level in cycling ewe. AnimRepordSci. 1984;6(1):233-238.
21. Hosseini Oghozi S, Nabatchian F, Mordadi A, Khodaverdi F. Alfalfa plant extract on breast cancer: an in vitro study. Faculty of Allied Health Sciences, Tehran University of Medical Sciences. Payavard Salamat. 2014; 2 (5): 415 -426 [Article in Persian]
22. Galluzzo P, Marino M. Nutritional flavonoids impact on nuclear and extranuclear estrogen receptor activities. GenesNutr. 2006;1(3-4):161-76.
23. De Kleijn MJ, Van der schouw YT, Banga JD, Van der Graaf Y. The effect of menopause on risk factors for ischemic diseases. Ned TijdschrGenneeskd. 1996; 140(9): 478-82.
24. Contero F, Abdo S, Vinueza D, Moreno J, Tuquinga M, Paca N. Estrogenic activity of ethanolic extract reo leaves of Ilex Guayusaloes and Medica Gosativa in rattus norvegicus. Harmacology Archives. 2015 (2): 95-99.

Original Article

The Phytoestrogenic Effect of Hydroalcoholic Extract of Alfalfa on Oxidative Stress and Follicle Formation in Adult Female Wistar Rats

Sistani S[1], Raeeszadeh M[2*], Amiri AA[2]

1- Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
2- Department of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Received: 20 Nov 2016 Accepted: 06 Jul 2017

Abstract

Background & Objectives: Today, Infertility problems including lack of follicle formation, among other things, are of paramount importance. The aim of this study was to investigate the effect of hydroalcoholic extract of alfalfa on oxidative stress and ovarian tissue in female rats.

Materials & Methods: In this experimental-interventional study, 24 rats weighing 200-250g were randomly divided into three groups: control (no treatment) and experimental groups (T1 and T2) which received alfalfa extract at 25 and 50mg/kg intraperitoneally for 25 days, respectively. Body weight of animals and their ovarian weight were measured. The left ovary was prepared for histological study. The antioxidant capacity in serum and malondialdehyde in right ovary extracts were also measured.

Results: At the end of the study, the body weight of the animals in both control and experimental groups compared to that of pre-intervention time, but the increase was not statistically significant ($P>0.05$). The most ovarian weight was observed in T2group (160g) and the lowest weight was in the control group (146g). The primary and secondary follicles and corpus luteum were the highest number in the T2group of alfalfa extract and the lowest number in the control group. The serum antioxidant capacity in T1 and T2groups were about 922 and 937µmol/ml, respectively, and the lowest amount was in the control group with 780µmol/ml and the difference was significant. Malondialdehyde concentration in control and T2gruop were the average of 0.35 and 0.22µmol/ml, respectively ($P<0.05$).

Conclusion: Hydroalcoholic extract of alfalfa with phytoestrogenic and oxidative stress control effects can enhance ovarian activity in adult rats.

Key Words: Hydroalcoholic extract of alfalfa, Ovary, Oxidative stress, Wistar rat

***Corresponding Author: Mahdieh Raeeszadeh,** Department of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
E-mail: vet_mr@yahoo.com