مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۵، شماره۲، خرداد و تیر ۱۳۹۹(شماره پی در پی ۱۳۹)

ارزیابی اثر محافظتی اسانس مرزه خوزستانی بر پتانسیل لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در موش‌های سوری تحت استرس اکسیداتیو القا شده با نانیل‌فنل

عباس احمدی*، فاطمه جمشیدی

گروه علوم پایه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۱۱/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: نانیل‌فنل(NP) به عنوان یک آلاینده زیست محیطی و سرکوب کننده سیستم ایمنی شناخته شده است که دارای اثرات سوء بر هسته سلول‌های جنسی، القای استرس اکسیداتیو و کاهش قدرت باروری است. هدف از این مطالعه تعیین و بررسی نقش محافظتی مرزه خوزستانی(SKEO) به عنوان یک آنتی اکسیدانت بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی متعاقب تجویز نانیل فنل بود.

روش بررسی: در این مطالعهٔ تجربی که در سال ۱۳۹۵ انجام شد،۴۰ سر موش سوری ماده ۸ـ۶ هفته‌ای با وزن ۲۵ـ۲۰ گرم به صورت تصادفی به چهار گروه مساوی شامل؛ کنترل(دریافت‌کننده روغن‌ذرت ۰/۳ سی‌سی)، نانیل‌فنل(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، دریافت کننده اسانس مرزه خوزستانی با دز(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و دریافت کننده نانیل-فنل همراه با مرزه خوزستانی با دز(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) همراه با مرزه خوزستانی با دز(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) تقسیم شدند و به مدت ۲۸روز به روش دهانی به وسیله گاواژ تیمار شدند. پس از پایان دوره تیمار، تحریک تخمک‌گذاری با استفاده از گنادوتروپین سرم مادیان آبستن(PMSG) و گنادوتروپین کوریونیک انسانی(HCG) انجام شد و پس از استحصال و ارزیابی تخمک، انجام لقاح با استفاده از اسپرم‌های نرمال به دست آمده از شش سر موش نر بالغ، در محیط کشت مایع لوله فالوپ انسانی(HTF) + ۴ میلی‌گرم به ازای هر سی‌سی آلبومین سرم گاوی(BSA) صورت گرفته و روند رشد جنین در طی ۱۲۰ مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری مقایسه نسبت‌ها(2Proportion) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در نتایج گروه نانیل فنل کاهش معنی‌داری در تمام پارامترهای کیفیت اووسیت و جنین، درصد لقاح(۶۵/۹۶)، درصد رویان دو سلولی(۶۴/۵۲) و بلاستوسیست(۲۹/۰۳) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد و تجویز اسانس مرزه خوزستانی توانست از اثرات سوء نانیل فنل بر بلوغ اووسیت جلوگیری نماید و باعث افزایش معنی‌دار کیفیت و تعداد اووسیت گردد. به واسطه تأثیر آنتی‌اکسیدانتی و اندروژنیک اسانس مرزه خوزستانی، تجویز آن به همراه نانیل فنل توانست از ایجاد سمیت تولید مثلی ممانعت نماید و باعث افزایش معنی‌دار درصد لقاح(۹۵/۸۳)، دوسلولی(۸۶/۹۶)، بلاستوسیست(۶۹/۵۷) و کیفیت جنین در مقایسه با گروه نانیل فنل گردید($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: تجویز اسانس مرزه خوزستانی به همراه نانیل فنل باعث کاهش اثرات سمی آن بر تعداد و کیفیت اووسیت‌ها، پتانسیل باروری داخل ازمایشگاهی و بهبود روند رشد جنینی و کاهش میزان توقف جنینی شد.

واژه‌های کلیدی: لقاح داخل آزمایشگاه، نانیل فنل، اووسیت، مرزه خوزستانی

***نویسنده مسئول: عباس احمدی، ارومیه**، دانشگاه ارومیه، گروه علوم پایه

Email: abbasahmadi60@yahoo.com

مقدمه

امروزه نگرانی فزآینده‌ای درباره پیامدهای اثرات سوء داروها و مواد سمی‌مختلف بر سیستم تولید مثلی، سلول‌های جنسی، توان باروری و رشد و تکامل جنین به وجود آمده است. در طول فرآیند اوولاسیون سلول‌های جنسی ماده مراحل تکاملی مختلفی را طی می‌کنند که در طول این مراحل می‌توانند به وسیله یک ماده سمی مورد تهاجم قرار گیرند(۱). آلاینده‌های زیست محیطی نظیر؛ نانیل فنل به طور گسترده به عنوان جزیی از مواد شوینده، رنگ‌ها، سموم دفع آفات و هم‌چنین در فرمولاسیون بسیاری از مواد دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند که دارای اثرات سمی روی سیستم تولید مثلی ماده می‌باشند(۲). نانیل فنل باعث تولید گامتهایی می‌شود که از نظر عملکردی و کیفیت آسیب دیده‌اند که می‌تواند منجر به بروز ناهنجاری‌های مادرزادی، مرگ جنین یا زمینه‌ای برای بروز سرطان باشد(۱). ناهنجاری‌های دستگاه تناسلی ماده می‌تواند در نتیجه تماس با سموم فنلی محیطی نظیرآلکیل فنول پلی‌اتوکسالات‌ها(APEs) به وجود آیند(۳). مکانیسم‌های مختلفی برای عملکرد نانیل فنل مطرح است. به عنوان مثال نانیل فنل می‌تواند به عنوان یک برهم زننده سیستم درون ریز در تغییر غلظت‌های هورمون‌هایی از جمله هورمون محرک فولیکولی(FSH)[۲]، هورمون لوتئینی(LH)[۳]، تستوسترون و استروژن عمل نماید(۷-۴). علاوه بر این پژوهش‌ها نشان می‌دهد که نانیل فنل اثرات سمی و مخرب خود را بر روی بافت تخمدان، حجم و تعداد اووسیت‌ها و میتوز سلول‌های تکا و گرانولوزا و یا اختلال در سیستم آنتی‌اکسیدانتی بدن از طریق القای تنش اکسیداتیو اعمال می‌نماید(۸). پارانانیل فنل اثرات استروژنیک و قابلیت اتصال با گیرنده‌های استروژن را دارد(۱۰۰۰۰ برابر کمتر از استرادیول ۱۷ بتا)(۹). سطوح پارانانیل فنل(P-NP)[۴] (از ۱۸۲ تا ۲۱۱ نانوگرم/گرم در پلاسما) می‌تواند اختلالات آندوکرینی، ایمنی و تولیدمثلی را به وجود آورد(۱۰). سلول‌ها از طریق مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی خود نظیر؛ آنزیم‌ها، ویتامین‌ها و برخی از مولکول‌های آنتی‌اکسیدان می‌توانند تعادلی بین تولید و تخریب رادیکال‌های آزاد اکسیژن(ROS)[۵] به وجود آورده و خود را از آسیب‌های اکسیداتیو محافظت نمایند، اما گاهی این تعادل بهم می‌خورد و ROS بیش ازحد تولید شده و منجر به آسیب اکسیداتیو بافت‌ها می‌شود(۱۱). بنابراین به منظور غلبه بر این عدم تعادل اکسیداسیون ـ احیاء، انواع مختلفی از آنتی‌اکسیدانت‌ها با منشا خارجی پیش‌بینی و ارایه گردیده‌اند(۱۲). مرزه خوزستانی(Satureja Khuzestanica) یک نوع گیاه بومی از خانواده لامیسه(Lamiaceae) می‌باشد که به فراوانی در مناطق جنوبی ایران رشد و گسترش یافته است و به خاطر کاربردهای درمانی آن در پزشکی سنتی و بومی، به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده و نیز ضد درد شناخته شده است(۱۳). هم‌چنین نشان داده شده

1-Alkylphenols polyethoxylathes(APEs)
2-Follicle stimulating Hormone(FSH)
3-Luteinizing Hormone(LH)
4-Para- Nonyl Phenol(P-NP)
5-Reactive Oxygen Species(ROS)

که تجویز مرزه خوزستانی باعث بهبود بیماری التهاب روده‌ها(IBD)[1] از طریق کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در موش‌های آزمایشگاهی شده است(۱۴). علاوه براین درمان با مرزه خوزستانی از بروز تنش اکسیداتیو و نیز تغییرات ایجاد شده در قندخون، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز، گلیکوژنولیز میتوکندریایی و گلوکونئوژنزیس کبدی در موش‌های صحرایی تحت درمان با مالاتیون جلوگیری کرده است(۱۶ و ۱۵). با توجه به اثرات سمی‌نانیل فنل مبنی بر القای تنش اکسیداتیو در دستگاه تناسلی ماده و نقش مرزه خوزستانی به عنوان یک آنتی اکسیدانت قوی این گونه می‌توان فرض کرد که این ماده قادر است اثرات مخرب این آلاینده زیست محیطی را خنثی نماید. از آن جا که تا به حال مطالعه‌ای در زمینه تأثیر مرزه خوزستانی به عنوان آنتی‌اکسیدانت در کاهش اثرات اکسیداتیو ناشی از نانیل فنل بر رشد جنین‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی صورت نگرفته است، هدف از این مطالعه تعیین و بررسی نقش محافظتی مرزه خوزستانی(SKEO) به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی متعاقب تجویز نانیل فنل بود.

روش بررسی

در این مطالعهٔ تجربی که در سال ۱۳۹۵ انجام شد، ۴۰ سر موش سوری ماده ۸ ــ۶ هفته‌ای با وزن ۲۵ـ۲۰ گرم وارد مطالعه شدند. کلیه مراحل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی و همچنین کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه با کد اخلاق IR-UU-AEC-1438- AD3 صورت گرفت.

حیوانات به مدت دو هفته جهت سازگاری با محیط در شرایط استاندارد با دمای۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ٦٠ـ٣٠ درصد و با سیکل نوری ١٤ ساعت روشنایی و ١٠ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند و آب و غذا به صورت آزاد در دسترس بود. سپس به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم و به مدت ۲۸ روز به روش دهانی(oral) به وسیله گاواژ تیمار شدند(۱۷). گروه کنترل تنها حلال دارو(روغن ذرت) را به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر، گروه دوم تنها نانیل فنل(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، گروه سوم تنها مرزه خوزستانی(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و گروه چهارم نانیل فنل(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) را به همراه مرزه خوزستانی(۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به صورت روزانه از طریق گاواژ دریافت کردند. برای انجام این مطالعه به تحریک تخمک‌گذاری نیاز بود که بدین منظور پس از پایان دوره تیمار و ۷۲ ساعت قبل از انجامIVF، تزریق ۷/۵ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبستن(PMSG) (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸ ساعت بعد از آن، تزریق ۷/۵ واحد بین المللی گنادوتروپین کوریونیک انسانی(HCG)(ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی انجام شد. مرحله اول از کار برای انجام IVF،

1-Inflammatory bowel disease(IBD)

تهیه اسپرم‌های نرمال از ۶ قطعه موش سوری نربالغ بارور بود که به روش بیهوشی با تزریق کتامین(۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به صورت تزریق داخل صفاقی) آسان‌کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی موش‌های نر با اتانول ۷۰ درصد استریل و پس از ایجاد برش در ناحیه شکم و جدا کردن بافت‌های هم‌بندی اطراف، دم اپیدیدیم همراه با مقداری از کانال دفران از بیضه جدا و به داخل پتری دیش ۳ سانتی‌متری حاوی محیط کشت HTF منتقل شدند و بعد از ایجاد چند برش در دم اپیدیدیم و فشار بر کانال دفران برای خروج اسپرم‌ها در محیط کشت، پتری دیش‌ها در داخل انکوباتور CO2 گذاشته شدند. بعد از گذشت ۰/۵ ساعت اسپرم‌ها خارج و در محیط کشت پخش شدند. سپس اسپرم‌ها شستشو داده شد و با استفاده از روش شناورسازی، اسپرم‌های متحرک جدا و جهت ظرفیت‌یابی به مدت یک ساعت در انکوباتور CO2 با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند(۱۸). پس از این زمان جهت انجام IVF از نمونه‌های اسپرم نرمال با تحرک بالای ۸۰ درصد و به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت استفاده شد. لازم به ذکر است محیط کشتHTF استفاده شده در این مطالعه حاوی آلبومین سرم گاوی(BSA) به میزان ۴ میلی‌گرم به ازای هر سی‌سی بود و قبل از شروع کار جهت تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود. مرحله دوم از کار، تخمک‌گیری از موش‌های ماده تیمار شده بود. بدین منظور۱۳ ساعت پس از تزریقHCG(صبح روز بعد)، آسان‌کشی حیوانات از طریق بیهوشی با کتامین (۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به صورت تزریق داخل صفاقی) انجام شد و با ایجاد برش در ناحیه شکم، لوله‌های رحمی حیوانات هر گروه جدا و به محیط کشتHTF منتقل شدند. سپس با استفاده از روش شکافتن تخمک‌ها خارج و پس از شستشو و بررسی کیفیت آنها به محیط لقاح(محیط کشت HTF حاوی (۴ میلی‌گرم به ازای هر سی‌سی) در زیر روغن معدنی منتقل شدند. سپس اسپرم‌های متحرک به دست آمده از مرحله اول به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، به محیط لقاح منتقل شدند. عمل لقاح حدود ۵-۳ ساعت بعد از اضافه کردن اسپرم صورت گرفت و بدین ترتیب زیگوت‌ها به دست آمدند(۱۸). زیگوت‌های به دست آمده از همه گروه‌ها در محیط کشت HTF به مدت ۱۲۰ ساعت کشت داده شدند و برای بررسی تأثیر تنش اکسیداتیو ناشی از تجویز نانیل فنل و اثر آنتی‌اکسیدانتی مرزه خوزستانی، مراحل رشد جنینی در این مدت در زیر میکروسکوپ فازکنتر است مورد ارزیابی قرار گرفت. در طی ۱۲۰ ساعت روند رشد جنینی از نظر میزان کلیواژ با بررسی درصد جنین‌های دو سلولی، درصد بلاستوسیست‌ها، کیفیت جنین‌ها، میزان توقف، لیز و فراگمانتاسیون جنین‌های مورد مطالعه انجام شد. برای مطالعه میزان لیز و فراگمانتاسیون، جنین‌ها در سه تیپ طبقه‌بندی شدند به طوری که در تیپ I جنین-های با لیز، فراگمانته شدن و نکروتیک بودن کامل، در تیپ II جنین‌های با لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از

بلاستومرها ودر تیپ III جنین‌های با تعداد کمی بلاستومرهای لیز و فراگمانته دارای وزیکول سیتوپلاسمیک قرار گرفتند(۱۸).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار Minitab و آزمون‌های آماری و روش آماری مقایسه نسبت‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی تعداد و کیفیت اووسیت‌های به دست آمده نشان داد تجویز نانیل فنل باعث کاهش تعداد اووسیت‌های به دست آمده به ازای هر حیوان در مقایسه با گروه کنترل شد و از نظر کیفیت اووسیت‌ها برای لقاح داخل آزمایشگاهی درصد بالایی از اووسیت‌ها در مقایسه با گروه کنترل فاقد کیفیت مناسب بودند و تعداد زیادی از اووسیت‌ها دارای توده کومولوسی فشرده، یا اووسیت‌هایی فاقد توده کومولوسی با کیفیت بد و به صورت لیز شده دیده شد و درصد کمی‌از اووسیت‌ها دارای کیفیت مناسب برای لقاح در مقایسه با گروه کنترل بودند. تجویز اسانس مرزه خوزستانی همراه با نانیل فنل سبب افزایش تعداد و کیفیت اووسیت‌ها در مقایسه با گروه نانیل فنل شد و این افزایش درصد اووسیت‌های مناسب از نظر آماری معنی‌دار بود($p<۰/۰۵$)(جدول۱).

یافته‌های مطالعه حاضر هم‌چنین نشان داد تجویز نانیل فنل سبب کاهش درصد لقاح در مقایسه با گروه کنترل شده و استفاده از اسانس مرزه خوزستانی به همراه نانیل فنل سبب بهبود و افزایش معنی‌دار درصد لقاح داخل آزمایشگاهی در مقایسه با گروه نانیل فنل گردید($p<۰/۰۵$). هم‌چنین از نظر بررسی درصد جنین‌های دو سلولی(که مشخص کننده وضعیت شکافتگی جنینی می‌باشد) در گروه نانیل فنل کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد و تجویز اسانس مرزه خوزستانی توانست سبب افزایش معنی‌دار درصد جنین‌های دو سلولی در مقایسه با گروه نانیل فنل شود($p<۰/۰۵$). نتایج حاصل از بررسی روند رشد جنینی نشان داد درصد جنین‌هایی که پس از ۱۲۰ ساعت به مرحلهٔ بلاستوسیست رسیده بودند مشخص کرد که نانیل‌فنل باعث کاهش این پارامتر از ۶۲/۲۹ درصد در گروه کنترل به۲۹/۰۳ درصد در گروه نانیل‌فنل شده است، در حالی که تجویز اسانس مرزه خوزستانی در گروه نانیل فنل همراه با اسانس مرزه سبب افزایش درصد بلاستوسیست‌ها به میزان ۵۰/۹۱ درصد شد(تصویر۳) که این افزایش نسبت به گروه نانیل‌فنل از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود($p<۰/۰۵$) (جدول ۱)(تصویر ۱). درصد کل جنین‌های متوقف شده در مراحل مختلف رشد که به مرحله بلاستوسیست نرسیده بودند، در گروه نانیل فنل در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش نشان داد و اکثر جنین‌های متوقف شده از نظر تیپ‌بندی بر اساس میزان لیز و فراگمانتاسیون بلاستومرها از نوع تیپ I با درصد بالایی از لیز و فراگمانتاسیون بودند، در حالی که استفاده از اسانس مرزه خوزستانی به همراه نانیل فنل سبب کاهش

معنی‌دار درصد جنین‌های متوقف شده در مقایسه با گروه نانیل فنل شد و جنین‌های متوقف شده دارای کیفیت بهتر و اکثراً از نوع تیپ III بودند(p<۰/۰۵)، (جدول۲)(تصویر۱ و ۳).

جدول۱ : مقایسه کیفیت اووسیت، لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

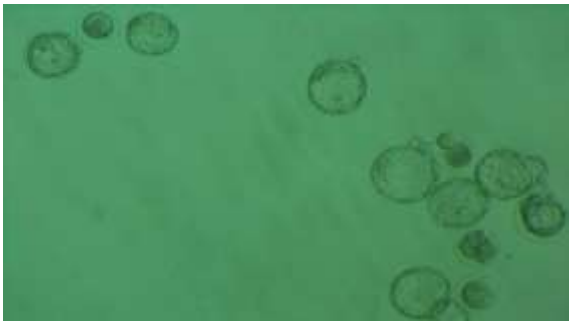
متغیر / گروه	کل اووسیت (درصد)	اووسیت به ازای حیوان (درصد)	اووسیت مناسب تعداد(درصد)	اووسیت نامناسب تعداد(درصد)	لقاح تعداد(درصد)	دوسلولی تعداد(درصد)	بلاستوسیست تعداد(درصد)
کنترل	۱۲۷	۱۲/۷	۱۲۷(۱۰۰)	۰(۰)	۱۲۲(۹۶/۰۶)	۱۱۱(۹۰/۹۸)	۷۶(۶۲/۲۹)
نانیل فنل	۷٤	۷/٤	۴۷(۶۳/۵۱)[a]	۲۷(۳۶/۴۹)[a]	۳۱(۶۵/۹۶)[a]	۲۰(۶۴/۵۲)[a]	۹(۲۹/۰۳)[a]
عصاره مرزه خوزستانی	۹۶	۹/۶	۹۶(۱۰۰)[bc]	۰(۰)[bc]	۹۲(۹۵/۸۳)[bc]	۸۰(۸۶/۹۶)[b]	۶۴(۶۹/۵۷)[bc]
نانیل فنل+ عصاره مرزه	۹۲	۹/۲	۶۶(۷۱/۷۴)[a]	۲۶(۲۸/۲۶)[a]	۵۵(۸۳/۳۳)[ab]	۴۶(۸۳/۶۴)[b]	۲۸(۵۰/۹۱)[b]

حرف a نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین نتایج مربوط به هر پارامتر در گروه‌های مورد مطالعه با گروه کنترل، حرفb نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین نتایج گروه‌های مورد مطالعه با گروه نانیل فنل و حرف c اختلاف معنی‌دار بین نتایج گروه‌های مورد مطالعه با گروه نانیل فنل به همراه عصاره مرزه را نشان می‌دهد(p<۰/۰۵).

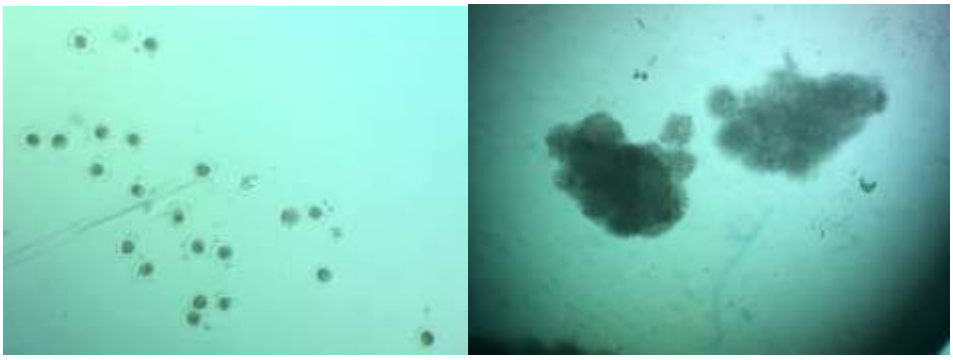
جدول۲: مقایسه گروه های مختلف از نظر درصد و نوع توقف جنینی

متغیر / گروه	جنین متوقف شده تعداد (درصد)	تیپ ۱ تعداد(درصد)	تیپ ۲ تعداد(درصد)	تیپ ۳ تعداد(درصد)
کنترل	۴۶(۳۷/۷)	۰(۰)	۴(۳/۲۸)	۴۲(۳۴/۴۳)
نانیل فنل	۲۲(۷۰/۹۷)[a]	۸(۲۵/۸۱)[a]	۶(۱۹/۳۵)[a]	۸(۲۵/۸۱)
عصاره مرزه خوزستانی	۲۸(۳۰/۴۳)[bc]	۰(۰)[bc]	۲(۲/۱۷)[b]	۲۶(۲۸/۲۶)
نانیل فنل+ عصاره مرزه	۲۷(۴۹/۰۹)[b]	۶(۱۰/۹۱)[a]	۴(۷/۲۷)	۱۷(۳۰/۹۱۰۶)

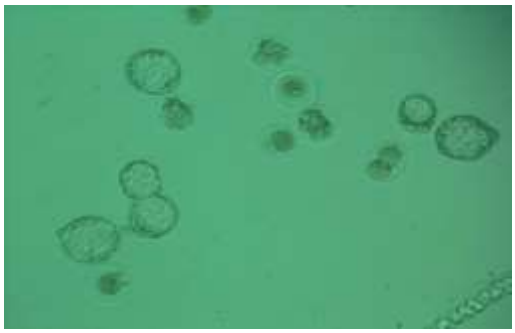
حرف a نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین نتایج مربوط به هر پارامتر در گروه‌های مورد مطالعه با گروه کنترل، حرفb نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین نتایج گروه‌های مورد مطالعه با گروه نانیل فنل وحرف c اختلاف معنی‌دار بین نتایج گروه‌های مورد مطالعه با گروه نانیل فنل به همراه عصاره مرزه را نشان می‌دهد(p<۰/۰۵).



تصویر۱: گروه کنترل، تمایز درصد بالایی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست با کیفیت مناسب بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون و درصد کمی از جنین‌ها که در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند



تصویر۲: گروه نانیل فنل، درصد بالایی ازجنین‌ها در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند و تنها درصد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند و بلاستوسیست‌های حاصله از نظر مورفولوژی کیفیت مناسبی ندارند و جنین‌های متوقف شده اکثرا از نوع تیپ I و II می‌باشند



تصویر۳: گروه تیمار شده با نانیل فنل به همراه عصاره مرزه، درصد بالایی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی در مقایسه با گروه نانیل فنل دارند. درصد کمی از جنین‌ها متوقف شده‌اند و اکثر جنین‌های متوقف شده از نوع تیپ II و III هستند.

بحث

استرس اکسیداتیو به معنای افزایش در سطح رادیکال‌های آزاد اکسیژن بدن است که از میزان دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن تجاوز می‌کند و نانیل فنل به عنوان یک عامل ایجاد کننده استرس اکسیداتیو باعث بروز اختلالات آندروژنی و عملکرد دستگاه تولید مثلی حیوان ماده می‌شود(۵) و با توجه به نتایج پژوهش‌های قبلی در زمینه اثرات آنتی‌اکسیدانتی گیاهان دارویی نظیر مرزه خوزستانی در افزایش توان باروری، هدف از این مطالعه تعیین و بررسی نقش محافظتی مرزه خوزستانی(SKEO) به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت بر روند رشد جنین‌های حاصل از لقاح داخل آزمایشگاهی متعاقب تجویز نانیل فنل بود.

آلکیل‌فنل اتوکسیلات به طور گسترده‌ای در تولید سورفاکتانت و شوینده‌ها برای مصارف خانگی و صنعتی به کار برده می‌شود. تحت شرایطی این ترکیبات به آلکیل‌فنل‌های مقاوم و پایدارتر مانند ۴ نانیل فنل تبدیل می‌شوند که در محیط زیست به صورت پایدار باقی مانده و وارد بدن موجودات زنده و موادغذایی می‌شوند(۲۰ و ۱۹). نانیل فنل در بین آلکیل‌فنل‌ها از لحاظ مقاومت و اندوخته شدن در چربی ارگانیسم‌های زنده رتبه‌دار است(۲۲ و ۲۱). هم‌چنین

پارانانیل فنل و ۴ نانیل فنل ایزومرهای خطی و شاخی نانیل فنل هستند که به عنوان مختل‌کننده دستگاه اندوکرین عمل کرده و منجر به اختلال در دستگاه تولید مثلی، افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو در سیستم تولید مثلی و بافت‌های دیگر نظیر؛ کبد، کلیه و مغز در بسیاری از حیوانات می‌شود(۲۴ و۲۳). از دیگر اثرات نانیل فنل می‌توان به تأثیرات آن بر تعداد فولیکول‌های تخمدانی، غدد پستانی، عملکرد رحمی، کاهش ضخامت جسم زرد، کاهش وزن تخمدان و حجم کورتکس آن و آسیب‌های ژنتیکی اشاره کرد(۲۵ و ۸). ثابت شده است که دزهای مختلف نانیل فنل منجر به تخلیه سیستم آنتی‌اکسیدانتی در تخمک‌های موش صحرایی می‌شود(۲۶). هم‌چنین نانیل فنل موجب کاهش ترشح FSH و LH می‌شود(۲۷) که این دو هورمون برای رشد اووسیت و پیشرفت مراحل فولیکولی ضروری است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان داد در گروه نانیل فنل تعداد اووسیت بالغ گرفته شده به دنبال تحریک تخمدانی به مراتب کمتر از گروه کنترل و سایر گروه‌ها بوده و از نظر کیفیت نیز دارای سطوح پایین‌تری نسبت به گروه کنترل بوده به طوری که سلول‌های گرانولوزا حالت تیره و فشرده‌ای را نشان می‌دادند، اووسیت در مواردی دچار لیز شده و تعدادی از اووسیت‌ها به صورت پارتنوژنز دچار تقسیمات میتوزی شده بودند و کیفیت پایینی را از نظر اووسیت‌های مناسب برای لقاح نشان دادند. مرزه خوزستانی یک گیاه اندمیک ایران است که دارای خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی است(۱۶ و ۱۴). جزء اصلی اسانس مرزه خوزستانی کارواکرول بوده و ترکیباتی نظیر؛ فلاونوئیدها، تری‌تربپنوئیدها، پی‌سایمین‌ها و تانن‌ها نیز در این گیاه گزارش شده است که کارواکرول و فلاوونوئیدها دارای خواص آنتی‌اکسیدانتی هستند(۳۱ـ۲۸). در توضیح اثرات محرک و تقویتی مرزه خوزستانی بر باروری، نتایج یک مطالعه نشان داد که تجویز روزانه ۲۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در موش‌های صحرایی ماده به مدت ۲۸ روز سطح گنادوتروپین‌ها را افزایش داده و سبب افزایش وزن تخمدان می‌گردد. علاوه بر این در موش‌های صحرایی ماده‌ای که مرزه خوزستانی را دریافت نمودند پس از طی دوران آبستنی، افزایش مشخص و معنی‌داری در تعداد مناطق لانه‌گزینی جنینی و نیز تعداد جنین‌های متولد شده مشاهده شد(۱۶). هم‌چنین مرزه خوزستانی از سمیت القا شده به وسیله مالاتیون از طریق تضعیف پارامترهای تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کند(۱۵). اسانس مرزه خوزستانی ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانتی بالایی دارد و با توجه به این اثر غنی از آنتی‌اکسیدانت آن، قابل قیاس با آنتی‌اکسیدانت‌های شناخته شده‌ای نظیر ویتامینE است(۳۲). در مطالعه دیگری تأثیر مرزه خوزستانی بر سیکلوفسفامید که باعث بروز سمیت تولیدمثلی از طریق ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود را بررسی کردند که با تجویز هم‌زمان مرزه خوزستانی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی و مؤثر این سمیت تولید مثلی تخفیف پیدا کرد(۳۳).

گزارش‌های متعددی گویای این مطلب است که در صورت بروز هر گونه اختلال در فرآیند رشد و بلوغ تخمک‌ها، این سلول‌ها در توان بارورسازی دچار مشکل می‌شوند(۳٤). بنابراین با استناد به کاهش تعداد تخمک‌ها در گروه نانیل فنل و بالا بودن تعداد تخمک‌های لیز شده در این گروه می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً نانیل فنل با تغییر در ژنوم اووسیت و پایداری غشای سلول‌های کومولوسی و گرانولوزا منجر به کاهش قدرت باروری و قدرت زنده مانی فولیکول می‌شود، لذا فولیکول‌های نابالغ و غیرطبیعی افزایش یافته و در نهایت، توان باروری کاهش می‌یابد. این در حالی است که با توجه به موارد بالا، عصاره مرزه خوزستانی این عوارض را به شکل قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد و باعث افزایش توان باروری آزمایشگاهی موش‌های درمان شده با عصاره می‌شود.

هم چنین عدم وجود امکانات لازم جهت پژوهش‌های مولکولی در اووسیت و جنین‌های حاصل، ارزیابی ظرفیت اکسیدانتی و آنتی‌اکسدانتی و فوق ریزبینی آنها در صورت تأمین امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی این مهم نیز قابل انجام خواهد بود، لذا به منظور افزایش دقت در این نوع مطالعه پیشنهاد می‌شود تا ادامه کار با استفاده از روش‌های سلولی- مولکولی و فوق ریزبینی صورت گیرد، همراه گردد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که نانیل فنل فرآیندهای اووژنز را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از طرفی با ایجاد تنش اکسیداتیو باعث آسیب به اووسیت شده و در نهایت منجر به کاهش باروری می‌شود. بنابراین تجویز برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها در شرایط تنش اکسیداتیو به منظور سم‌زدایی از بافت‌ها ضروری به نظر می‌رسد و منطقی است که کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از عوامل محیطی آسیب‌رسان مانند نانیل فنل به وسیله یک آنتی‌اکسیدان قوی و مطمئن بتواند به کمتر شدن سمیت تولیدمثلی ناشی از آن منجر شود. عصاره مرزه خوزستانی با دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، اثرات سمی ناشی از نانیل فنل را در بافت تخمدان و فولیکول خنثی می‌کند و منجر به افزایش قابلیت باروری داخل آزمایشگاهی می‌شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دوره دکترای حرفه‌ای دامپزشکی دانشگاه ارومیه می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1.Robaire B, Hales BF. Mechanisms of action of cyclophosphamide as a male-mediated developmental toxicant: Advances in Male Mediated Developmental Toxicity. 1th ed. Boston: AEMB; 2003; 169-80.
2.Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D, Boubelik M. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. Reproductive Biology and Endocrinology 2003; 1(1): 30.
3.Chitra K, Latchoumycandane C, Mathur P. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. Archives of Toxicology 2002; 76(9): 545-51.
4.Miller WL. Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 1995; 55(5-6): 607-16.
5.Kim HS, Shin JH, Moon HJ, Kang IH, Kim TS, Kim IY, et al. Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. Reproductive Toxicology 2002; 16(3): 259-68.
6.Núñez-Delicado E, Sánchez-Ferrer A, García-Carmona F. Hydroperoxidative oxidation of diethylstilbestrol by lipoxygenase. Archives of Biochemistry and Biophysics 1997; 348(2): 411-4.
7.Okai Y, Sato EF, Higashi-Okai K, Inoue M. Effect of endocrine disruptor para-nonylphenol on the cell growth and oxygen radical generation in Escherichia coli mutant cells deficient in catalase and superoxide dismutase. Free Radical Biology and Medicine 2004; 37(9): 1412-8.
8.Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT, Chung KS. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research 1998; 51(4): 436-44.
9.Lutz I, Kloas W. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: I. Environmental pollution and estrogen receptor binding. Science of the Total Environment 1999; 225(1-2): 49-57.
10.Privalle CT, Crivello JF, Jefcoate CR. Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P-450 in rat adrenal gland. Proceedings of the National Academy of Sciences 1983; 80(3): 702-6.
11.Bindhumol V, Chitra K, Mathur P. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. Toxicology 2003; 188(2-3): 117-24.
12.Ali A, Bilodeau J, Sirard M. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. Theriogenology 2003; 59(3-4): 939-49.
13.Jamzad Z. A new species of the genus Satureja (Labiatae) from Iran. Iran J Bot 1994; 6(2): 215-8.
14.Ghazanfari G, Minaie B, Yasa N, Nakhai LA, Mohammadirad A, Nikfar S, et al. Biochemical and histopathological evidences for beneficial effects of Satureja Khuzestanica Jamzad essential oil on the mouse model of inflammatory bowel diseases. Toxicology Mechanisms and Methods 2006;16(7): 365-72.
15.Basiri S, Esmaily H, Vosough-Ghanbari S, Mohammadirad A, Yasa N, Abdollahi M. Improvement by Satureja khuzestanica essential oil of malathion-induced red blood cells acetylcholinesterase inhibition and altered hepatic mitochondrial glycogen phosphorylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities. Pesticide Biochemistry and Physiology 2007; 89(2): 124-9.
16.Abdollahi M, Salehnia A, Mortazavi SHR, Ebrahimi M, Shafiee A, Fouladian F, et al. Antioxidant, antidiabetic, antihyperlipidemic, reproduction stimulatory properties and safety of essential oil of Satureja Khuzestanica in rat in vivo: a toxicopharmacological study. Medical Science Monitor 2003; 9(9): BR331-5.
17.Xu Q, Ming Z, Dart AM, Du XJ. Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2007; 34(5-6): 499-507.
18.Hedrich H. The laboratory mouse: handbook of experimental animals. 2th ed. New York: Academic Press; 2006; 439-46.
19.Guenther K, Heinke V, Thiele B, Kleist E, Prast H, Raecker T. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. Environmental Science & Technology 2002; 36(8): 1676-80.
20.Ying GG, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. Environment International 2002; 28(3): 215-26.

21.Gilbert J, Startin JR, McGuinness JD. Compositional analysis of commercial PVC bottles and studies of aspects of specific and overall migration into foods and simulants. Food Additives & Contaminants 1986; 3(2): 133-43.
22.Ahel M, McEvoy J, Giger W. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. Environmental Pollution 1993; 79(3): 243-8.
23.Zha CW, Xi YL, Huang L, Zhao LL. Effect of sublethal exposure to chlordecone on life history characteristics of freshwater rotifer Brachionus calyciflorus Pallas. Bulletin of Eenvironmental contamination and toxicology. 2007;78(1):79-83.
24.Hsieh CY, Miaw CL, Hsieh CC, Tseng HC, Yang YH, Yen CH. Effects of chronic 4-n-nonylphenol treatment on aortic vasoconstriction and vasorelaxation in rats. Archives of Toxicology 2009; 83(10): 941-6.
25.Soleymani Mm, Nourafshan A, Hamta A, Moumeni HR, Abnousi M, Mahmoudi M, et al. Effects of vitamin E on ovarian tissue of rats following treatment with p-nonylphenol. A stereological Study 2010; 8(1): 1-9.
26.Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. Journal of Chemical Neuroanatomy 2005; 29(3): 173-8.
27.Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. Asian Journal of Andrology 2008; 10(1): 134-45.
28.Farsam H, Amanlou M, Radpour M, Salehinia A, Shafiee A. Composition of the essential oils of wild and cultivated Satureja khuzistanica Jamzad from Iran. Flavour and Fragrance Journal 2004; 19(4): 308-10.
29.Sefidkon F, Ahmadi S. Essential oil of satureja khuzistanica jamzad. Journal of Essential Oil Research 2000; 12(4): 427-8.
30.Moghaddam FM, Farimani MM, Salahvarzi S, Amin G. Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated Satureja khuzistanica. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine 2007; 4(1): 95-8.
31.Vosough-Ghanbari S, Rahimi R, Kharabaf S, Zeinali S, Mohammadirad A, Amini S, et al. Effects of Satureja khuzestanica on serum glucose, lipids and markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus: a double-blind randomized controlled trial. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2010; 7(4): 465-70.
32.Ahmadvand H, Tavafi M, Shahsavari G, Khosrobeigi A, Bagheri S, Abdolahpour F. Hypolipidemic and antiatherogenic effects of Satureja khozestanica essential oil in alloxan-induced type 1 diabetic rats. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 2013; 15(8): 26-9.
33.Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadirad A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Human & Experimental Toxicology 2008; 27(12): 901-10.
34.Zhang YQ, Mao Z, Zheng YL, Han BP, Chen LT, Li J, et al. Elevation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in the mouse brain after chronic nonylphenol exposure. International Journal of Molecular Sciences 2008; 9(10): 1977-88.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Evaluation of the Protective Effect of *Satureja khozestanica* Essential Oil on the Potential Fertilization in Vitro and the Process of Embryonic Growth in Syrian Mice Under the Oxidative Stress Induced by Nonophenol

Ahmadi A*, Jamshidi F

Department of Basic Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 29 Jan 2019 Accepted: 17 Feb 2020

Abstract

Background & aim: Nano phenol (NP) is known to be an environmental contaminant and an immunosuppressant agent, which has adverse effects on sex cell's nucleus, inducing stress, oxidative stress and reducing fertility. The aim of the present study was to determine the protective role of *Satureja khozestanica* as an antioxidant on the growth process of fetuses resulting from in-vitro fertilization following Nano phenol administration.

Methods: In the present experimental study conducted in 2016, 40 mature female mice, aged 6-8 weeks, weighing 20-25 grams, were randomly divided into 4 equal groups. The control group received corn oil orally and the test groups were treated with NP (225mg/kg), *khozestanica* essential essence (225 mg/kg), NP(225mg/kg) + *khozestanica* essential essence (225mg/kg) for 28 consecutive days orally by gavages. PMSG and HCG were administrated for stimulating the superovulation process. The sperms were obtained from 6 mature male mice. Following oocyte collection in-vitro fertilizing was performed using HTF+4mgBSA medium. The fertilized oocytes were incubated for 120 hours and the embryo development were studied. Two proportion test was used for statistical analyses**.** ($p<0.05$).

Results: A significant decrease in all quality parameters of oocyte and embryo, fertilization percentage (65.96), percentage of two-celled embryos (64.52) and blastocyst (29.03) were observed in the Nano Phenol group in comparison with the control group. Prescribing *khozestanica* essential essence was able to prevent the adverse effects of nanoparticles on the maturity of oocytes and cause a significant increase in the quality and number of oocytes. Due to the antioxidant and androgenic effects of *khozestanica* essential essence, its administration together with Nano phenol was able to prevent reproductive toxicity and significantly increase the fertilization rate (95.83), do cellulite (86/96), blast cyst (6/57).

Conclusion: Co-administration of the *khozestanica* essential essence with Nanophenol reduced toxic effects on the number and oocyte's quality, in-vitro fertilization potential, improved the embryo development, and reduced the arrested embryo.

Key words: In Vitro Fertilization, Nonyl Phenol, Oocyte, *Satureja khuzestanica*

***Corresponding author: Ahmadi A,** Department of Basic Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: abbasahmadi60@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Ahmadi A, Jamshidi F. Evaluation of the Protective Effect of *Satureja khozestanica* Essential Oil on the Potential Fertilization in Vitro and the Process of Embryonic Growth in Syrian Mice Under the Oxidative Stress Induced by Nonophenol. Armaghane-danesh 2020; 25(2): 201-212.