Evaluation of oxidant effect of aqueous extract of Ruta graveolens on mice ovary

Hoshyari A., PhD[1], Najafi G.R., PhD[2], Zareai L., PhD[3]
1. DVScAnatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran,Tel:044-33447450,Email: a.hoshyari.vet@gmail.com
2.AssistantProfessor, Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3.AssistantProfessor, Department of Anatomical Science, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences ,Khorramabad, Iran.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

ABSTRACT

Background and Aim:*Ruta Graveolens* (RG) commonly called Sedab, has been known as a medical plant since ancient times. Flavonoids, rutin (quercetin□ □□-rutinoside), quercetin, and furanocoumarins are the most common chemicals found in Sedab. Flavonoids have hepatotoxic and cytotoxic effects and the most abundant flavonoid in Sedab is quercetin. Due to its anti-proliferative and pro-apoptosis activities, quercetin can exert negative influences on ovaries and fertility in females. This study was performed to analyze Sedab aqueous extract and evaluate its oxidative effects.

Materials and Methods: This study included 30 female mice. The animals were divided into control and RG groups. Control group received a daily dose of 0.2 mL of normal saline, and Sedab aqueous extract 300mg/kg/day was given to RG group for 14 days. The levels of MDA, NO and TAC were measured and analysis of the extract were performed by HPLC to evaluate its oxidative effects.

Results: Administration of Sedab extract led to a significant increase in the MDA levels in RG group, in the 1st and 2nd weeks and increased levels of TAC in the 2nd and 3rd weeks compared to the results found in the control group. Meanwhile, NO levels increased and TAC levels decreased significantly in Sedab group in the 1st week compared to those in the control group. Analysis revealed that each 10 mg aqueous extract contains 0.017 mg quercetin.

Conclusion: The results of this study suggested that a dose of 300mg/kg Sedab aqueous extract produced oxidative effect on mice ovarian tissue and after discontinuing administration of the extract and subsequent drop of its serum levels, the anti-oxidative effects appeared.

Keywords: Malone di-aldehyde, Nitric oxide, Total anti-oxidative capacity, Anti-fertility, *RutaGraveolens*, Mouse.

Received: May 23, 2016 **Accepted:** Jan 24, 2017

بررسی اثر اکسیدانت عصاره آبی سداب بر تخمدان موش سوری

عارف هوشیاری[۱] غلامرضا نجفی[۲] لیلازارعی[۳]

۱.دکتری تخصصی علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن ثابت:۰۴۴-۳۳۴۴۷۴۵۰ Email:a.hoshyari.vet@gmail.com

۲.استادیار،گروه آناتومی، بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

چکیده

زمینه و هدف: روتاگراوئولنس(RG) به طور معمول تحت عنوان سداب، از زمان قدیم به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است. فلاونوئیدها، روتین (کوئرستین β-3 روتینوسید)، کوئرستین، فورانوکومارین ها بیشترین ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه سداب هستند. فلاونوئیدها دارای اثرات هپاتوتوکسیک و سیتوتوکسیک بوده و بیشترین نوع فلاونوئید موجود در سداب؛کوئرستین است.کوئرستین بدلیل فعالیت ضد تکثیری و پروآپوپتوز می تواند اثرات منفی روی تخمدان و باروری در ماده داشته باشد.این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات اکسیدانتی و آنالیز عصاره آبی سداب انجام گرفت.

روش بررسی: در مطالعه تجربی حاضر، ۳۰ موش ماده استفاده شد. حیوانات به ۲ گروه کنترل و RG تقسیم شدند. گروه‌های کنترل ۰/۲ میلی لیتر نرمال سالین و گروه‌های RG عصاره آبی RG را با دوز mg/kg ۳۰۰ در هر روز به صورت خوراکی به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. جهت بررسی اثرات اکسیداتیو آن اندازه گیری MDA، NO و TAC و آنالیز عصاره، توسط دستگاه HPLC انجام گرفت.

یافته‌ها: عصاره آبی سداب باعث افزایش معنی‌دار مقادیر MDA در بافت تخمدان در هفته اول و دوم و همچنین افزایش معنی‌دارمقادیرTAC در هفته دوم و سوم نسبت به گروه کنترل گردید، ضمن اینکه افزایش معنی‌دار مقادیر NO و کاهش معنی‌دار TAC درهفته اول گروه سداب نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. آنالیز عصاره نشان داد که هر ۱۰ میلی گرم عصاره آبی سداب حاوی ۰/۰۱۷ میلی گرم کوئرسیتین می شود.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان دادکه عصاره آبی سداب در دز mg/kg ۳۰۰ دارای اثر اکسیدانتی بر بافت تخمدان موش می باشد و بعد از قطع مصرف عصاره و کاهش سطح سرمی آن، اثرات آنتی اکسیدانتی آن ظاهر می شود.

کلیدواژه ها: مالون دی آلدئید، نیتریت اکساید، ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی، ضد باروری، روتاگراوئولنس،موش

وصول مقاله:۹۵/۳/۳ اصلاحیه نهایی:۹۵/۱۰/۱۵ پذیرش:۹۵/۱۱/۵

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

مقدمه

آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فورانوکومارین ها و تانن ها از مهمترین مواد فعال در گیاه سداب هستند(۲و۱).روتین، کوئرستین ۳ بتا (quercetin-3-β- rutinoside) از مهمترین فلاونوئیدهای موجود در گیاه سداب هستند. که کوئرستین بیشترین نوع فلاونوئید موجوددر سدابمی باشد(۳). در این گیاه ایمپراتورین(imperatorin)، ایزوایمپراتورین(isoimperatorin)، گزانتوتوکسین(xanthotoxin)، برگاپتن (bergapten) ،سورالن (psoralen)، آلکالوئیدهای گراوئولین (alkaloids graveoline) و روتامین (rutamine)نیز وجود دارد (۹-۴).

کوئرستین و روتین قادرند از فعالیت آنزیم آلدئید اکسیداز کبد جلوگیری کنند(۱۰). فعالیت های سیکلواکسیژناز۲ (cycloxygenase) ومیلوپراکسیداز(myeloperoxidase) و غلظت تیوباربیتوریک اسید (thiobarbituric acid)را کاهش دهند، عصاره متانولیک سداب، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت، مقادیر ویتامین های E،C و گلوتاتیون را افزایش می دهد(۱۱). عصاره های مختلف سداب دارای خاصیت ممانعت از اکسیداسیون L-DOPA catalysed را دارند(۱۰).

روتین و کوئرستین دارای خواص مهمی از جمله ضد التهاب و ضد اکسیداتیو دارند. کوئرستین دارای فعالیت ضد تکثیر ی داشته و پروآپوپتوز است. تکامل فولیکول ها شدیداً وابسته به پروسه های آنژیوژنز است که کوئرستین اثر مهاری بر تکثیر، مهاجرت و تمایز سلولهای آندوتلیال در آنژیوژنز دارد. لذا کوئرستین می تواند اثرات منفی روی تخمدان داشته باشد(۷). و از طرفی فلاونوئیدها دارای اثرات هپاتوتوکسیک و سیتوتوکسیک نیزدارند و می توانند با برخی از پروتئین های انتقال دهنده هورمون بر همکنش نشان داده و همچنین برخی از آنزیم ها را غیر فعال کنند و این باعث تغییر غلظت بافتی هورمون ها از قبیل استروئیدها و پروستاگلاندینها می شود(۱۲).

این گیاه همچنین دارای گلوکوزید روتین(glucosiderutin) (۱۳) استفوراکومارین ها (سورالن ها) ((psoralens) (furanocoumarins) یا آلکالوئید های فوروگوینولون (furoquinolone alkaloids) در سداب جمع می شوند(۱۴) .

ترکیبات آربورینین (arborinine) و فورانوآکریدون های (furanoacridones) جدا شده از سداب در شرایط in vitro بر روی سه نوع سلول سرطانی، MCF-7 (آدنوکارسینومای سینه)، HeLa (آدنوکارسینومای سرویکس) وA431 (کارسینومای اپیدرموئید پوست) انسان بکار رفته و از دوکسوروبیسین (Doxorubicin) و سیس پلاتین (cisplatin) بعنوان کنترل مثبت استفاده شده است؛ که آربورینین دارای بیشترین اثر ضد تکثیری بوده است(۱۵) . عصاره های پترولوم اتر، اتیل استات و متانول آبی سداب دارای فعالیت سمیت سلولی و ضد باکتریایی است(۱۶).

تحقیقاتی که بر روی خواص دارویی این گیاه در مناطق مختلف دنیا انجام گرفته است، نشان می‌دهد که این گیاه در جوامع مختلف کاربرد دارویی دارد. مهم‌ترین خواص دارویی ذکر شده برای گیاه سداب شامل؛ فعالیت آنتی اکسیدانت، ضدالتهاب، سیتوتوکسیک، آنتی تومور، آنتی آریتمیک، آنتی‌آندروژنیک، ضد بارداری و باروری می‌باشد. این خواص گسترده به دلیل تنوع مواد موثره موجود در این گیاه می‌باشد(۱۷-۱۵).

عرضه این داروی گیاهی عمدتاً به شکل سنتی است. در اغلب موارد فروشندگان و مصرف‌کنندگان اطلاعات کافی در خصوص عوارض جانبی، دوز مصرفی، شکل مصرف، شرایط جسمی و سلامتی مصرف‌کننده ندارند. تحقیقات بر روی اثرات ضد باروری سداب در حیوان نر به صورت وسیع انجام گرفته است(۱۸). ولی تحقیقات انجام یافته بر

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

روی حیوان ماده اندک بوده است. بررسی ابعاد مختلف اثر آنتی اکسیدانتی عصاره سداب و نحوه تاثیر و مکانیسم ضد بارداری آن بر بافت تخمدان می تواند ملاحظات و احتیاطات استفاده از این عصاره را روشن نماید. تا بتوانیم به تکمیل دستورالعمل استفاده از عصاره سداب کمک نماییم. هدف از تحقیق حاضر ارزیابی اثر اکسیدانی عصاره آبی سداب بر روی بافت تخمدان موش سوری با استفاده از اندازه گیری پارامتر های مالون دی-آلدئید(MDA) ، ظرفیت آنتی اکسیدانتی(TAC) و نیترات بافتی بود و یکی از اهداف مهم دیگراین مطالعه بررسی اثرات اکسیدانتی یا آنتی اکسیدانتی عصاره سداب در فازهای زمانی مشخص (متعاقب تجویز و قطع تجویز دارو) بود تا بتوانیم دائمی یا موقتی بودن اثرات سداب را نیز مورد ارزیابی قرار دهیم .

روش بررسی

حیوانات:

در این تحقیق از ۳۰ سر موش سوری نژاد NMRI ماده در دو گروه سداب و کنترل استفاده شد.حیوانات مورد آزمایش در این مطالعه از بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی ارومیه تهیه گردید. تمام موش ها در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در اتاقی با دمای ۲۰ الی ۲۵ درجه با دسترسی آزاد به مواد غذایی و آب نگهداری شدند. موش های ماده مورد استفاده در شروع آزمایش در سن ۶ هفتگی بودند.

گروههای آزمایش:

گروه دریافت کننده سداب(Sod) تعداد۱۵سر موش سوری برای این گروه استفاده شد. که این گروه خود به سه زیر گروه؛ سداب هفته اول(Sod1)، سداب هفته دوم (Sod2)و سداب هفته سوم(Sod3)تقسیم شدند. در هر گروه ۵ موش قرار داده شدو چهارده روز، روزانه ۳۰۰mg/kg عصاره آبی سداب فرموله شده در حجم ۰/۲ میلی لیتر، از طریق گاواژ دریافت کردند.

گروه کنترل تعداد ۱۵ عدد موش سوری برای این گروه استفاده شد. که این گروه نیز خود به سه زیر گروه کنترل هفته اول، کنترل هفته دوم و کنترل هفته سوم (هر گروه ۵ موش) تقسیم شدند. و تا چهارده روز همزمان با گروه های سداب روزانه ۰/۲ میلی لیتر نرمال سالین از طریق گاواژ دریافت کردند.

نمونه برداری:

در گروه سداب عصاره به مدت ۱۴ روز از طریق گاواژ خورانده شد و سپس قطع گردید. در برخورد با حیوانات مورد آزمایش تمامی اصول و موازین اخلاقی و کار با حیوانات رعایت گردید. و نمونه برداری ها بعد از قطع مصرف عصاره در سه نوبت تحت عنوان هفته اول ، هفته دوم و هفته سوم به طریق زیر انجام گرفت:

هفته اول

۲۴ ساعت بعد از اتمام گاواژ عصاره، به هر کدام از موش های گروه های هفته اول در هردو گروه ۱۰ واحد بین اللملی گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (Pregnant serum gonadotropin)(PMSG) از طریق داخل صفاقی تزریق گردید(۲۰و۱۹). (لازم به ذکر است که این بررسی چون قسمتی از پایان نامه تخصصی بوده که در آن بلوغ آزمایشگاهی نیز باید انجام می گرفت از آن جهت گنادوتروپین تزریق گردیده است). ۴۸ ساعت بعد از تزریق هورمون موش ها،ابتدا توسط گاز CO_2 بیهوش شده، سپس توسط جابجایی مهره های گردنی آسان کشی شدند و سپس تخمدان ها برداشته شدند. این مرحله نمونه برداری مصادف با روز ۱۷ از شروع آزمایش بود.

هفته دوم

یک هفته بعد از قطع مصرف عصارهمصادف با روز ۲۲ از شروع آزمایش به هر کدام از موش های گروه های هفته دوم در هردو گروه ۱۰ واحد بین اللملی گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (PMSG) از طریق داخل صفاقی تزریق گردید(۲۰و ۱۹).

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

۴۸ ساعت بعد از تزریق هورمون موش ها ابتدا توسط گاز CO2 بیهوش شده، توسط جابجایی مهره های گردنی آسان کشی و سپس تخمدان ها برداشته شدند. این مرحله نمونه برداری مصادف با روز ۲۴ از شروع آزمایش بود.

هفته سوم

دو هفته بعد از قطع مصرف عصاره ، مصادف با روز ۲۹ از شروع آزمایش به هر کدام از موش های گروه های هفته سوم در هردو گروه ۱۰ واحد بین اللملی گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (PMSG) از طریق داخل صفاقی تزریق گردید. ۴۸ ساعت بعد از تزریق هورمون موش ها ابتدا توسط گاز CO2 بیهوش شده،توسط جابجایی مهره های گردنی آسان کشی و سپس تخمدان ها برداشته شدند. این مرحله نمونه برداری مصادف با روز ۳۱ از شروع آزمایش بود.

عصاره گیری:

گیاه سداب تهیه شده و بعد از تایید در دانشکده کشاورزی ارومیه، توسط آسیاب برقی خرد گردید.سپس در ظرف های جداگانه، مقدار ۱۰۰ گرم از پودر را در ۱۰۰۰ میلی لیتر نرمال سالین حل گردید و در دمای اتاق روی دستگاه شیکر به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. بعد از اتمام این مدت ابتدا محلول موجود چند بار از صافی عبور داده شد و بعد از آن مایع به دست آمده با دور RPM ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی جمع آوری گردید و در دمای اتاق تبخیر شد. بعد از تبخیر، عصاره به رنگ قهوه ای تیره ای به دست آمد. عصاره حاصل در ظرف دربسته ای قرار داده شد و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید(۲۱). قبل از شروع دوره محلول عصاره آبی سداب با غلظت ۳۰۰mg/kgدر ۰/۲ میلی لیتر تهیه گردید و در یخچال نگهداری شد.

روش اندازه گیری مالون دی-آلدئید(MDA):

برای این منظور کل تخمدان توسط هموژن ایزر در فسفات بافر (PH 7.4) هموژن شدند. ۰/۵ میلی لیتر از هموژن حاصل با ۲/۵ میلی لیتر ارتوفسفوریک اسید یک در صد در درون لوله های ۱۰ میلی لیتری مخلوط شد. سپس ۱ میلی لیتر TBA ۰/۶۷ درصد به آن اضافه گردید. به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب گرم در حال جوش قرار داده شدند. بعد از گذشت۴۵ دقیقه به سرعت سرد شدند. سپس نمونه هادر لوله ی دیگری با ان-بوتیل الکل مخلوط شده و میزان MDA بافتی درطول موج ۵۳۵ نانومتر غلظت مالون دی آلدهید توسط اسپکتوفوتومتری و به وسیله ضریب جذب کمپلکس مالون دی آلدهید تری باربیتوریک اسید که به صورت نانوگرم در میلی گرم پروتئین است محاسبه شد. محلول TEP به میزانnmol/ml ۵ به عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد.(۲۲و ۱۲)

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانتی(TAC):

به منظور ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانتی بافت تخمدان، از آزمایش قدرت احیاء کنندگی فریک یا FRAP تست استفاده شد. به طور خلاصه در PH پایین که توسط استات بافر ایجاد شده بود اثر احیاء شوندگی کمپلکس Fe^{III}-TPTZ به فرم فرو مورد ارزیابی قرار گرفت به این صورت که این کمپلکس در مجاورت استات بافر رنگ آبی ایجاد می کند و در نتیجه می توان آن را درnm ۵۹۳ اندازه گیری کرد. محلول آبکی Fe^{II} و غلظت مناسبی از محلول تازه تهیه شده ی اسکوربیک اسید به ترتیب در قالب بلانک و محلول استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند(۱۲).

اندازه گیری متابولیت‌های نیتریک اکساید:

اندازه گیری نیتریک اکساید در بافت تخمدان می تواند مسیر تخمک گذاری و استرس نیتروزاتیو را مشخص نماید.برای سنجش NO از روش Griess استفاده شد. این روش ، روشی ساده و سریع برای تعیین غلظت نیتریک اکساید می باشد. این روش بر پایه تبدیل سریع نیتریک اکساید به ترکیبات پایدار نیتریت می باشد. براین اساس نیتریت در یک محیط اسیدی تبدیل به HNO2 می شود که با سولفانیلامید، نمک دیازینیوم را می سازد که با ۱NED

[1]N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

ترکیب شده و ماده رنگی حاصل می آید که می توان در جذب نوری با طول موج ۵۴۰ نانو متر اندازه گیری کرد. به طور خلاصه، در ابتدا ازمایع رویی بافت های هموژن تهیه شده از بافت روده مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از هر نمونه به پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و و سپس ۲۰ میکرولیتر ازAGriess را به هر خانه افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و سپس ۲۰ میلی لیتر از Griess B (محتوی NED) اضافه شدو بعد از دو دقیقه در طول موج ۵۴۰ نانومتر با ELISA Reader (مدل STATFax 3200 ساخت کشور آمریکا) قرائت شدند و مقادیر نیتریک اکساید با منحنی استاندارد تهیه شدهاز سریال رقیق شده از سدیم نیترات محاسبه (۲۴و ۲۳).

روش آنالیز با HPLC

برای تعیین غلظت کوئرستین یکی از مواد فعال اصلی عصاره سداب از دستگاه HPLCمدل Agilent با مشخصات ذیل استفاده گردید. فازمتحرک به صورت ایزوکراتیک استفاده شد.

1. Eclipse XDB-C 18 column (5 µm, 4.6 mm × 15 cm)
2. Mobile phase: methanol–distilled water–trifluoroacetic acid (700 + 300 + 1, v/v/v)
3. Flow rate : 0.8 mL/min
4. UV detector : 254 nm wavelength.

آنالیزآماری:

جهت انجام مطالعات آماری ازبرنامهSPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. داده های بدست آمده توسط تستهای ANOVAودانکن موردتحلیل وتجزیه آماری قرارگرفتند. نتایج بصورت میانگین وانحراف معیار(Mean ± SEM) نشان داده شد و p <۰/۰۵بعنوان معنی داردرنظرگرفته شد.

یافته‌ها

این بررسی جهت مطالعه اثرات اکسیداتیو یا آنتی اکسیداتیو عصاره انجام گرفت از این رو از واکنش MDA و NO برای بررسی اثر اکسیداتیو و TAC برای بررسی اثر آنتی اکسیدانتی عصاره مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت.

نتایج شاخصMDA:

با اندازه گیری MDA و انجام آنالیز آماری در بین گروه ها، مشخص گردید؛ که در هفته اول در گروه سداب ، افزایش معنی داری(p<۰/۰۵)با کنترل وجود داشت.

اندازه گیری MDA در بین گروه های مذکور در هفته دوم مشخص گردید؛ که میانگین MDA در هفته دوم گروه سداب ، افزایش معنی داری (p<۰/۰۵) با کنترل داشت.

همچنین اندازه گیری MDA در هفته سوم نشان داد؛ که در این هفته در گروه سداب ، تغییرات معنی داری(p<۰/۰۵) با کنترل و وجود ندارد (جدول۱).

نتایج شاخصNO :

بااندازه گیریNO و انجام آنالیزآماری دربین گروهها، مشخص گردیدکه درهفته اول درگروه سداب،افزایش معنی داری(p<۰/۰۵) باکنترل وجوددارد.

بااندازه گیریNOدربین گروههای مذکوردرهفته دوم مشخص گردید؛که میانگین اندازه گیریNOدرهفته دوم گروه سداب،اختلاف معنی داری(p<۰/۰۵) باکنترل ندارد.

بااندازه گیریNOدربین گروههای مذکوردرهفته سوم مشخص گردید؛که میانگین اندازه گیریNOدرهفته سوم گروه سداب،اختلاف معنی داری(p<۰/۰۵) باکنترل ندارد. (جدول۲).

نتایج شاخصTAC :

با اندازه گیری TAC و انجام آنالیز آماری در بین گروه ها، مشخص گردید که در هفته اول در گروه سداب ، کاهش معنی داری(p<۰/۰۵) با کنترل وجود دارد.

با اندازه گیری TAC در بین گروه های مذکور در هفته دوم مشخص گردید؛ که میانگین اندازه گیری TAC در هفته دوم گروه سداب، افزایش معنی داری(p<۰/۰۵) با کنترل دارد. با اندازه گیری TAC در بین گروه های مذکور در هفته سوم مشخص گردید؛ که میانگین اندازه گیری TAC

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

در هفته سوم گروه سداب ، افزایش معنی داری (p<۰/۰۵) با کنترل دارد (جدول۳).

جدول ۱ . میانگین (MDA(nmol/mg of protein در گروه‌های مورد آزمایش

هفته سوم		هفته دوم		هفته اول	
سداب	کنترل	سداب	کنترل	سداب	کنترل
۵/۵۶±۰/۵۳*	۴/۶۶±۰/۳۸*	۱۱/۸±۱/۰**	۴/۸±۱/۰*	۹/۵۵±۰/۴۵**	۶/۰۱±۰/۳*

مقادیر MDA در هفته اول و دوم بین گروه کنترل و سداب معنی دار است اما در هفته سوم تفاوت معنی داری وجود ندارد(p<۰/۰۵).

جدول۲ . میانگین (NO (nmol/mg of protein در گروه‌های مورد آزمایش

هفته سوم		هفته دوم		هفته اول	
سداب	کنترل	سداب	کنترل	سداب	کنترل
۳۲/۴۷±۰/۸۵*	۴۰/۰۶±۴/۸۲*	۶۰/۷۶±۱/۴۴*	۵۴/۳۵±۵/۴۵*	۱۱۳/۰۶±۴/۲۴**	۸۰/۴۶±۲/۳۶*

مقادیر NO درهفته اول بین گروه کنتر ل وسداب معنی داراست امادرهفته دوم و سوم تفاوت معنی داری وجودندارد(p<۰/۰۵)

جدول ۳ .میانگین(TAC (Absorbance 593 nmدر گروه‌های مورد آزمایش

هفته سوم		هفته دوم		هفته اول	
سداب	کنترل	سداب	کنترل	سداب	کنترل
۰/۰۴۶±۰/۰**	۰/۰۲۵±۰*	۰/۰۵۳±۰/۰۰۱**	۰/۰۲۵±۰/۰۰۱*	۰/۰۱۰±۰/۰۰۵**	۰/۰۲۶±۰/۰۰۸*

مقادیر TAC درهر سه هفته بین گروه کنترل وسداب تفاوت معنی داری دارد(p.<۰/۰۵)

میزان کوئرستین عصاره سداب

نتایج آنالیزعصاره برای تعیین مقدارکوئرسیتین:

آنالیز HPLC عصاره آبی سداب بعد از بدست آوردن منحنی استاندارد با ضریب رگرسیون ۰/۹۹۹ نشان داد که هر ۱۰ میلی گرم عصاره مذکور حاوی۰/۰۱۷ میلی گرم کوئرسیتین می باشد.

بحث

درتحقیق حاضرمشخص گردیدکه مصرف عصاره آبی سداب درموش سوری با دزmg/kg ۳۰۰ باعث افزایش معنی دار مقادیرMDA دربافت تخمدان درهفته اول ودوم و همچنین افزایش معنی دارمقادیرTACدرهفته دوم وسوم نسبت به گروه کنترل میشود. رادیکالهای آزاد در بافت تخمدان باعث کاهش حساسیت سلولهای گرانولوزا به هورمون های گناد وتروپین شده که در نتیجه آن می توان شاهد آترزی تخمدان ها بود(۲۵). البته قابل ذکر است که در خود بافت تخمدان به صورت فیزیولوژیک رادیکالهای آزاد نیز تولید می‌شوند که عدم تعادل بین تولید و ظرفیت آنتی اکسیدانتی تخمدان می‌تواند اثرات اکسیدانتی داشته و موجب آسیب بافت نیز شوند(۲۶). مکانیسمهای فوق می توانند توجیه کننده اثرات سداب در افزایش TACدرهفته دوم وسوم نسبت به گروه کنترل در مطالعه حاضر باشد. افزایش معنی دارمقادیرNO در هفته اول وکاهش معنی دار TACدرهفته اول گروه سداب نسبت به گروههای کنترل مشاهده گردید. که سیر نتایج نشان دهنده کاهش اثرات مضر این عصاره با کاهش میزان سطح آن در بافت در طی گذشت هفته ها می باشد چرا که در این دز ابتدا اثرات اکسیدانتی ظاهر گردیده ولی با قطع مصرف دارو و سپری

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

شدن زمان که مصادف با کاهش مقادیر مؤثره آن در بافت می تواند باشد اثر اکسیدانتی کاهش یافته، و بافت به سمت بهبود و ترمیم می رود. همچنین در تحقیقات دیگری که انجام شده مشخص کرده اند که گیاه سداب به صورت مستقیم و غیر مستقیم خاصیت ناباروری داشته و می تواند باعث ناباروری و کاهش تولید اسپرم شود. در جنس ماده نیز می تواند از لانه گزینی تخمک بارور شده جلوگیری کند(۲۷). نتایج این مطالعه در تایید یافته‌های ما نشان داد که اثرات سداب وابسته به دز می باشد.

در مطالعه‌ی Cartas و همکاران در تایید یافته‌های ما، نشان دادند تجویز مزمن سداب در موش باعث سنتز و آزاد شدن NO می شود و این اثر بدلیل وجود ترکیباتی از جمله روتین، کوئرستین و سایر فلاونوئیدها موجود در آن است که درغلظت بالا اثر اکسیدانتی عصاره سداب بیشتر از اثر آنتی اکسیدانتی آن است(۲۸). همانطور که در بالا گفته شد افزایش نیتریک اکساید میتواند هم خاصیت آنتی اکسیدانتی را اعمال کند و هم میتواند به عنوان اکسیدانت در بافت عمل کند افزایش بیان ژن iNOS در بافت باعث افزایش میزان تولید NO شده و در نتیجه با خاصیت اکسیدانتی خود می تواند در بافت باعث تحلیل و از دست رفتن باروری شود(۲۹) که همسو با نتایج مطالعه حاضرمی‌باشد.

در مطالعه حاضردر آنالیز عصاره سداب میزان کوئرستین نیز اندازه گیری شد و وجود فلاونوئیدها مشاهده گردید. Stashenko و همکاران، با استفاده از کروماتوگرافی گازی ترکیبات شیمیایی سداب را شناسایی و گزارش کردند که این گیاه حاوی انواع گلیکوزید، کومارین‌ها، فلاونوئیدها می باشد(۹). واز میان این دسته مواد، فلاونوئیدها از این نظر که توانایی حذف رادیکالهای آزاد را دارند. اهمیت زیادی داشته است(۳۰). ملکی نژاد و همکاران دربررسی اثرات سیلیمارین که بعنوان یک فلاونوئید است دریافتندکه سیلیمارین دردزهای پایین دارای اثرآنتی اکسیدانتی ودردزهای بالادارای اثراکسیدانتی بوده است موید نتایج مطالعه حاضراست.

در بررسی حاضرکه در هفته اول حداکثرمیزان سطح سرمی دربدن حیوان بوده مقادیرMDA و NO بالاو مقادیرTACپایین بوده لذا در این دوره زمانی، عصاره دارای اثراکسیدانتی داشته درحالیکه هم زمان با قطع مصرف عصاره وکاهش سطح سرمی آن، مقادیر MDA وNO پایین ومقادیرTACبالا رفته لذا اثراکسیدانتی درهفته دوم وسوم کم شده واثرات آنتی اکسیدانتی ظاهرشده است. پس می توان گفت که عصاره در دز پایین اثر خود را به عنوان آنتی اکسیدانت عمل می‌کند. که این مواد درغلظتهای بالا اثر اکسیدانتی ودرغلظتهای پایین اثرآنتی اکسیدانتی دارند. پرتی وهمکاران دربررسی فعالیت ضدتوموری سداب اعلام کردندکه عصاره سداب درغلظت پایین ازپراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری میکند؛ اما در غلظتهای بالابه عنوان پراکسیدانت عمل میکند(۳۱). در تحقیقی دیگرDiwan و همکاران دریافتند که فعالیت رادیکال NO ناشی از عصاره سداب وابسته به دز می باشد(۳۲) که با نتایج مطالعه حاضر همسو است.

توجه به نتایج بدست آمده بیانگر برگشت پذیر بودن اثرات سیتوتوکسیک و اکسیدانتی این عصاره می باشد و هر چه از زمان مصرف عصاره گذشته است اثرات منفی آن کاهش یافته است. و این احتمال که در دز های پایین این عصاره می تواند اثر آنتی اکسیدانتی و در دزهای بالا اثر آکسیدانتی داشته باشد تقویت می گردد.

نتیجه گیری

یافته ها بیانگر اثرات سیتوتوکسیک شدید این عصاره در دز مورد استفاده بوده است .

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامه دکترای تخصصی علوم تشریحی دامپزشکی تحت عنوان اثرات عصاره آبی گیاه سداب روی تغییرات هیستومورفومتریک و هیستوشیمی بافت تخمدان، تغییرات فوق ریزبینی تخمک و بلوغ

آزمایشگاهی در موش به شماره ۲۲-۵۲ در سال ۱۳۹۱ دانشکده دامپزشکی ارومیه بوده و عملیات آزمایشگاهی آن در آزمایشگاه فارماکولوژی و بافت شناسی دانشکده دامپزشکی ارومیه انجام گرفته است. از پرفسور حسن ملکی نژاد استاد فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی و مسئول آزمایشگاه آقای علی کریمی که در کارهای عملی و هماهنگی های لازم کمک فراوانی نمودند؛کمال تقدیر و تشکر را داریم.

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018

Reference

1.Kuzovkina I, Al'terman I, Schneider B. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of Ruta graveolens. Phytochemistry 2004;65:1095-100.

2.Chávez M, Franco I, González M, Tlatenco M. Tradición Herbolaria y remedios caseros. México City: Ce-Ácatl, AC. 2003.p.1-80.

3.Lahoz E, Contillo R, Nicoletti R, Oliva A. Efficacy of rue extract-sodium bicarbonate and fungicides at reduced rates for control of powdery mildew on tobacco [Nicotiana tabacum L.-Campania]. Atti delle Giornate Fitopatologiche (Italy). 2000;2: 293-298

4.i Serra JB. Gran Enciclopedia de las Plantas Aromáticas y Medicinales. Tikal Ediciones, Barcelona. 2007;pp:180-183

5.Kirtikar K, Basu B. Indian medicinal plants with illustration. 2nd ed. Vol-11th Dehradun: International Book Distributors. 2003.p.3747-49.

6.Prashar D, Saklani S. Internationale Pharmaceutica Sciencia. 2012; 2:13-16.

7.Stochmalová A, Sirotkin A, Kádasi A, Alexa R. Physiological and medical effects of plant flavonoid quercetin. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences 2013; 2013; 2:1915-1926

8.William D, Warden C, David H. Pharmacographia Indica; A history of the principal drugs of vegetable origin. Vol-III Srishti book distributors: New Delhi. 2005.p.286-91.

9.Stashenko EE, Acosta R, Martínez JR. High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (Ruta graveolens L.). Journal of Biochemical and Biophysical Methods 2000;43:379-90.

10.Sailani M, Moeini H. Effect of Ruta graveolens and Cannabis sativa alcoholic extract on spermatogenesis in the adult wistar male rats. Indian Journal of Urology 2007;23:257.

11.Ratheesh M, Helen A. Anti-inflammatory activity of Ruta graveolens Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats. African Journal of Biotechnology 2007;6: 1209-1211.

12.Parray SA, Bhat J, Ahmad G, Jahan N, Sofi G, IFS M. Ruta graveolens: from traditional system of medicine to modern pharmacology: an overview. Am J Pharm Tech Res 2012;2:239-52.

13.Shen S-C, Lee W-R, Lin H-Y, Huang H-C, Ko C-H, Yang L-L, et al. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E 2 production. European Journal of Pharmacology 2002;446:187-94.

14.Ekiert H, Szewczyk A, Kuś A. Free phenolic acids in Ruta graveolens L. in vitro culture. Die Pharmazie. 2009;64:692-4.

15.Réthy B, Zupkó I, Minorics R, Hohmann J, Ocsovszki I, Falkay G. Investigation of cytotoxic activity on human cancer cell lines of arborinine and furanoacridones isolated from Ruta graveolens. Planta Medica 2007;73:41-8.

16.Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I. Antimicrobial and cytotoxic activity of Ruta graveolens. Fitoterapia 2005;76:344-7.

17.Ratheesh M, Shyni G, Helen A. Methanolic extract of Ruta graveolens L. inhibits inflammation and oxidative stress in adjuvant induced model of arthritis in rats. Inflammopharmacology 2009;17:100-5.

18.Harat ZN, Sadeghi MR, Sadeghipour HR, Kamalinejad M, Eshraghian MR. Immobilization effect of Ruta graveolens L. on human sperm: A new hope for male contraception. Journal of Ethnopharmacology 2008;115:36-41.

19.Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Gelpke MDS, Hsueh AJ. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2005;102:9206-11.
20.Martin-Coello J, Gonzalez R, Crespo C, Gomendio M, Roldan E. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (Mus musculus, Mus spretus and Mus spicilegus). Theriogenology 2008;70:1004-13.
21.Halvaei I, Sadeghipour Roodsari HR, Naghibi Harat Z. Acute effects of Ruta graveolens L. on sperm parameters and DNA integrity in rats. Journal of Reproduction & Infertility 2012;13:33-8.
22.Hassanzadeh A, Shahvaisi K, Hassanzadeh K, Izadpanah E, Amini A, Moloudi MR. Effects of rebamipide and encapsulating rebamipide with chitosan capsule on inflammatory mediators in rat experimental colitis. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 2015;20:94-104.
23.Moloudi R, Nabavizadeh F, Nahrevanian H, Hassanzadeh G. Effect of different doses of GLP-2 (Teduglutide) on acute esophageal lesion due to acid-pepsin perfusion in male rats. Peptides 2011;32:2086-90.
24.Malekinejad H, Cheraghi H, Alizadeh A, Khadem-Ansari M, Tehrani A, Varasteh S, editors. Nitric oxide and acute phase proteins are involved in pathogenesis of mycophenolate mofetil–induced gastrointestinal disorders in rats. Transplantation proceedings; Elsevier.2011;43: 2741-2746.
25.Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. Journal of the Society for Gynecologic Investigation 2001;8:S40-S2.
26.Aten RF, Duarte KM, Behrman HR. Regulation of ovarian antioxidant vitamins, reduced glutathione, and lipid peroxidation by luteinizing hormone and prostaglandin F2 alpha. Biology of Reproduction 1992;46:401-7.
27.Asgarpanah J, Khoshkam R. Phytochemistry and pharmacological properties of Ruta graveolens L. Journal of Medicinal Plants Research 2012;6:3942-9.
28.Cartas Heredia L, Mascher D, Juárez Oropeza MA, Farías J, Paredes Carbajal C. Effects of the chronic ingestion of an infusion of Ruta chalepensis on the vasomotor responses of rat aortic rings. Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromát 2011;10:414-22.
29.Raghav SK, Gupta B, Shrivastava A, Das HR. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase and IL-1β through suppression of NF-κB activation by 3-(1′-1′-dimethyl-allyl)-6-hydroxy-7-methoxy-coumarin isolated from Ruta graveolens L. European Journal of Pharmacology 2007;560:69-80.
30.Weiss RF. Weiss's herbal medicine: Thieme; 2001; 271-279.
31.Preethi K, Kuttan G, Kuttan R. Anti-tumour activity of Ruta graveolens extract. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2006;7:439.
32.Diwan R, Shinde A, Malpathak N. Phytochemical composition and antioxidant potential of Ruta graveolens L. in vitro culture lines. Journal of Botany 2012; Volume 2012:1-6

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 3:20 +0330 on Tuesday January 23rd 2018