

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

Hoshvari A., PhD¹, Najafi G.R., PhD², Zareai L., PhD³

1. DVScAnatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, Tel:044-33447450, Email: a.hoshvari.vet@gmail.com

2. Assistant Professor, Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

3. Assistant Professor, Department of Anatomical Science, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: *Ruta Graveolens* (RG) commonly called Sedab, has been known as a medical plant since ancient times. Flavonoids, rutin (quercetin-3-O-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، لیلازاری^۳

۱. دکتری تخصصی علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن ثابت: ۰۴۴-۳۳۴۴۷۴۵۰ Email: a.hoshiyari.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

چکیده

زمینه و هدف: روتاگراونولنس (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، فورانو کومارین 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. گروه های کنترل ۰/۲ میلی لیتر نرمال سالین و گروه های RG عصاره آبی RG را با دوز ۳۰۰ mg/kg در هر روز به صورت خوراکی به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. جهت بررسی اثرات اکسیدانتیو آن اندازه گیری MDA، NO و TAC و آنالیز عصاره، توسط دستگاه HPLC انجام گرفت.

یافته ها: عصاره آبی سداب باعث افزایش معنی دار مقادیر MDA در بافت تخمدان در هفته اول و دوم و همچنین افزایش معنی دار مقادیر TAC در هفته دوم و سوم نسبت به گروه کنترل گردید، ضمن اینکه افزایش معنی دار مقادیر NO و کاهش معنی دار TAC در هفته 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 کوئرستین می شود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که عصاره آبی سداب در دز ۳۰۰ mg/kg 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، نیتريت اکساید، ظرفیت تام آنتی اکسیدانتی، ضد باروری، روتاگراونولنس، موش

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

مقدمه

باعث تغییر غلظت بافتی هورمون ها از قبیل استروئیدها و پروستاگلاندینها می شود(۱۲).

این گیاه همچنین دارای گلوکوزید روتین (glucosiderutin) (۱۳) استفورا کومارین ها (سورالن ها) (furanocoumarins (psoralens)) یا آلکالوئید های فوروگوانولون (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 (آدنوکارسینوما ی سینه)، HeLa (آدنوکارسینوما ی سرویکس) و A431 (کارسینوما ی 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 تکثیر 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 می دهد که این گیاه در جوامع مختلف کاربرد دارویی دارد. مهم ترین خواص دارویی ذکر شده برای گیاه سداب شامل فعالیت آنتی اکسیدانت، ضدالتهاب، سیتوتوکسیک، آنتی تومور، آنتی آریتمیک، آنتی آندروژنیک، ضد بارداری و باروری می باشد. این خواص گسترده به دلیل تنوع مواد موثره موجود در این گیاه می باشد(۱۷-۱۵).

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

آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، فورانو کومارین ها و تانن ها از مهمترین مواد فعال در گیاه سداب هستند(۱۰۲). روتین، کوئرستین ۳ بتا (quercetin-3-β- rutinoside) از مهمترین فلاونوئیدهای موجود در گیاه سداب هستند. که کوئرستین بیشترین نوع فلاونوئید موجود در سداب می باشد(۳). در این گیاه ایمپراتورین (imperatorin)، ایزوایمپراتورین (isoimperatorin)،

گزانتوتوکسین (xanthotoxin)، برگاپتن (bergapten)، سورالن (psoralen)، آلکالوئیدهای گراوولین (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 سیکلواکسیژناز ۲ (cyclooxygenase) و میلوپراکسیداز (myeloperoxidase) و غلظت تیوباربیتوریک اسید (thiobarbituric acid) را کاهش دهند، عصاره متانولیک سداب، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت، مقادیر ویتامین های E، C و گلوکاتینون 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 پروآپتوز است. تکامل فولیکول ها شدیداً وابسته به پروسه های آنژیوژنز است که کوئرستین اثر مهار ی 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 نیز دارند 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

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 اکسیدانتی 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 دیگر این 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) تعداد ۱۵ سر 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 ۳۰۰ mg/kg عصاره آبی سداب فرموله شده در حجم ۰/۲ میلی لیتر، از طریق گاوژ 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 گاوژ دریافت کردند.

نمونه برداری:

در گروه سداب عصاره به مدت ۱۴ روز از طریق گاوژ خوراندند 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 گاوژ عصاره، به هر کدام از موش های گروه های هفته اول در هر دو گروه ۱۰ واحد بین المللی گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (Pregnant PMSG) (serum gonadotropin) از طریق داخل صفاقی تزریق گردید (۱۹ و ۲۰). (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 CO2 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 عصاره مصادف با روز ۲۲ از شروع آزمایش به هر کدام از موش های گروه های هفته دوم در هر دو گروه ۱۰ واحد بین المللی گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (PMSG) از طریق داخل صفاقی تزریق گردید (۱۹ و ۲۰).

۴۸ ساعت بعد از تزریق هورمون موش ها ابتدا توسط گاز CO₂ بیهوش شده، توسط جابجایی مهره های گردنی آسان کشتی 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 هر دو گروه ۱۰ واحد بین المللی گنادوتروپین سرم مادیان آبتن (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 کشتی 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 ۱۰۰۰۰ RPM به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع روپی 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 ۳۰۰ mg/kg در 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 گذشت ۴۵ دقیقه به سرعت سرد شدند. سپس نمونه هادر لوله ی دیگری با ان-بوتیل الکل مخلوط شده و میزان MDA بافتی در طول موج ۵۳۵ نانومتر غلظت مالون دی آلدئید توسط اسپکتوفوتومتری و به وسیله ضریب جذب کمپلکس مالون دی آلدئید تری باریتوریک اسید که به صورت نانوگرم در میلی گرم پروتئین است محاسبه شد. محلول TEP به میزان ۵ nmol/ml به عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد. (۲۲ و ۱۲)

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدان (TAC):

به منظور ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدان 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 در ۵۹۳ nm اندازه گیری کرد. محلول آبیکی Fe^{II} و غلظت مناسبی از محلول تازه تهیه شده ی اسکورییک اسید به ترتیب در قالب بلانک و محلول استاندارد مورد استفاده قرار گرفتند (۱۲).

اندازه گیری متابولیت های نیتریک اکساید:

اندازه گیری نیتریک اکساید در بافت تخمدان می تواند مسیر تخمک گذاری و استرس نیتروژاتیو 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 نیتريت می باشد. براین اساس نیتريت در یک محیط اسیدی تبدیل به HNO₂ می شود که با سولفانیلامید، نمک دیازینیوم را می سازد که با NED¹

¹N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride

برای بررسی اثر اکسیداتیو و TAC برای بررسی اثر آنتی اکسیدانتی عصاره مورد سنجش و مقایسه قرار گرفت.

نتایج شاخص MDA:

با اندازه گیری MDA و انجام آنالیز آماری در بین گروه ها، مشخص گردید؛ که در هفته اول در گروه سداب، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.05$) با کنترل داشت.

همچنین اندازه گیری MDA در هفته سوم نشان داد؛ که در این هفته در گروه سداب، تغییرات معنی داری ($p < 0.05$) با کنترل و وجود ندارد (جدول ۱).

نتایج شاخص NO:

با اندازه گیری NO و انجام آنالیز آماری در بین گروهها، مشخص گردید که در هفته اول در گروه سداب، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) با کنترل وجود دارد.

با اندازه گیری NO در بین گروههای مذکور در هفته دوم مشخص گردید؛ که میانگین اندازه گیری NO در هفته دوم گروه سداب، اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) با کنترل ندارد.

با اندازه گیری NO در بین گروههای مذکور در هفته سوم مشخص گردید؛ که میانگین اندازه گیری NO در هفته سوم گروه سداب، اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) با کنترل ندارد. (جدول ۲).

نتایج شاخص TAC:

با اندازه گیری TAC و انجام آنالیز آماری در بین گروه ها، مشخص گردید که در هفته اول در گروه سداب، کاهش معنی داری ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.05$) با کنترل

دارد. با اندازه گیری TAC در بین گروه های مذکور در هفته سوم مشخص گردید؛ که میانگین اندازه گیری TAC

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 از مایع 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 میکرو لیتر از Griess AG 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 شد و 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 شده از سریال رقیق شده از سدیم نیترات محاسبه (۲۴ و ۲۳).

روش آنالیز با HPLC

برای تعیین غلظت کوئرستین یکی از مواد فعال اصلی عصاره سداب از دستگاه HPLC مدل Agilent با مشخصات ذیل استفاده گردید. فاز متحرک به صورت ایزوکراتیک استفاده شد.

1. Eclipse XDB-C 18 column (5 μ m, 4.6 mm \times 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.

آنالیز آماری:

جهت انجام مطالعات آماری از برنامه SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. داده های بدست آمده توسط تستهای ANOVA و دانکن مورد تحلیل و تجزیه آماری قرار گرفتند. نتایج بصورت میانگین و انحراف معیار (Mean \pm SEM) نشان داده شد و $p < 0.05$ بعنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

این بررسی جهت مطالعه اثرات اکسیداتیو یا آنتی اکسیداتیو عصاره انجام گرفت از این رو از واکنش MDA و NO

در هفته سوم گروه سداب، افزایش معنی داری ($p < 0.05$) با کنترل دارد (جدول ۳).
 جدول ۱. میانگین (MDA) (nmol/mg of protein) در گروه‌های مورد آزمایش

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

مقادیر MDA در هفته اول و دوم بین گروه کنترل و سداب معنی دار است اما در هفته سوم تفاوت معنی داری وجود ندارد ($p < 0.05$).

جدول ۲. میانگین (NO) (nmol/mg of protein) در گروه‌های مورد آزمایش

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

مقادیر NO در هفته اول بین گروه کنترل و سداب معنی دار است اما در هفته دوم و سوم تفاوت معنی داری وجود ندارد ($p < 0.05$).

جدول ۳. میانگین (Absorbance 593 nm) TAC در گروه‌های مورد آزمایش

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

مقادیر TAC در هر سه هفته بین گروه کنترل و سداب تفاوت معنی داری دارد ($p < 0.05$).

هورمون‌های گناد و تروپین شده که در نتیجه آن می‌توان شاهد آترزی تخمدان‌ها 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 آنتی‌اکسیدانتی تخمدان می‌تواند اثرات اکسیدانتی داشته و موجب آسیب بافت نیز شوند (۲۶). مکانیسم‌های فوق می‌توانند توجیه‌کننده اثرات سداب در افزایش TAC در هفته دوم و سوم نسبت به گروه کنترل در مطالعه حاضر باشد. افزایش معنی دار مقادیر NO در هفته اول و کاهش معنی دار TAC در هفته 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 هفته‌ها می‌باشد چرا که در این دز ابتدا اثرات اکسیدانتی ظاهر گردیده ولی با قطع مصرف دارو و سپری

میزان کوئرستین عصاره سداب نتایج آنالیز عصاره برای تعیین مقدار کوئرستین: آنالیز HPLC عصاره آبی سداب بعد از بدست آوردن منحنی استاندارد با ضریب رگرسیون ۰/۹۹۹ نشان داد که هر ۱۰ میلی‌گرم عصاره مذکور حاوی ۰/۰۱۷ میلی‌گرم کوئرستین می‌باشد.

بحث

در تحقیق حاضر مشخص گردید که مصرف عصاره آبی سداب در موش سوری با دوز ۳۰۰ mg/kg باعث افزایش معنی دار مقادیر MDA در بافت تخمدان در هفته اول و دوم و همچنین افزایش معنی دار مقادیر TAC در هفته دوم و سوم نسبت به گروه کنترل می‌شود. رادیکال‌های آزاد در بافت تخمدان باعث کاهش حساسیت سلول‌های گرانولوزا به

در بررسی حاضر که در هفته اول حداکثر میزان سطح سرمی در بدن حیوان بوده مقادیر MDA و NO بالا و مقادیر TAC پایین بوده لذا در این دوره زمانی، عصاره دارای اثر اکسیدانتی داشته درحالیکه هم زمان با قطع مصرف عصاره و کاهش سطح سرمی آن، مقادیر MDA و NO پایین و مقادیر TAC بالا رفته لذا اثر اکسیدانتی در هفته دوم و سوم کم شده و اثرات آنتی اکسیدانتی ظاهر شده است. پس می توان گفت که عصاره در دز پایین اثر خود را به عنوان آنتی اکسیدانت عمل می کند. که این مواد در غلظتهای بالا اثر اکسیدانتی و در غلظتهای پایین اثر آنتی اکسیدانتی دارند. پرتی و همکاران در بررسی فعالیت ضدتوموری سداب اعلام کردند که عصاره سداب در غلظت پایین از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری میکند؛ اما در غلظتهای بالا به عنوان پراکسیدانت عمل میکند (۳۱). در تحقیقی دیگر Diwan 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 دزهای پایین این عصاره می تواند اثر آنتی اکسیدانتی و در دزهای بالا اثر اکسیدانتی 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 ریزیخی تخمک و بلوغ

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 یافته های ما نشان داد که اثرات سداب وابسته به دز می باشد.

در مطالعهی Cartas و همکاران در تایید یافته های 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 در غلظت 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 حاضر می باشد.

در مطالعه حاضر در 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 در بررسی اثرات سیلیمارین که بعنوان یک فلاونوئید است دریافتند که سیلیمارین در دزهای پایین دارای اثر آنتی اکسیدانتی و در دزهای بالا دارای اثر اکسیدانتی بوده است. موید نتایج مطالعه حاضر است.

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.

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

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 Scientia*. 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, Martinez 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 E₂ production. *European Journal of Pharmacology* 2002;446:187-94.
14. Ekiert H, Szewczyk A, Ku 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, Shahvaisy 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-1 through suppression of NF- κ B 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