Archive of SID

Original Article

Protective Effects of Wheat Germ oil on the IVF, Oxidative Stress and In Vitro Zygote Development in Carbamazepine Treated Epileptic Male Mice

Ghodrat Ebadi Manas [1*], *Gholamreza Najafi* [2]

[1]*Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran.*

[2]*Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Ebadi Manas Ghodrat;
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran.

Email:
g.ebadi@cfu.ac.ir;
ebadimanas@gmail.com

Received: 27 Nov,2019
Accepted: 10 Feb, 2020

Abstract

***Background and Objectives*:** Epilepsy is a neurological disorder caused by abnormal electrical discharges from the brain. Carbamazepine is used to treat epilepsy.Over time, this drug may increase oxidative stress and reproductive abnormalities in patients with epilepsy. Wheat germ oil has the highest amount of vitamin E, among other vegetable oils. The aim of this study was to evaluate the effect of wheat germ oil as an antioxidant-rich source on oxidative stress and in vitro fertilization in carbamazepine-treated epileptic male mice.

Methods: In this experimental study, 40 adult maleand 20 adult female Balb/C strain mice with a mean weight of 25-30g were used. Male animals divided into 4 groups (n=10),including: control; pentylenetetrazole (40 mg/kg/day); pentylenetetrazole (40 mg/kg/day) + carbamazepine (180 mg/kg/day) andpentylenetetrazole (40 mg/kg/day) +carbamazepine (180 mg/kg/day) + wheat germ oil (500 mg/kg/day). All doses were given to the male rats orally for 42 days based on g/kg body weight. Five healthy female mice were used for ovulation in each group. At the end of the treatment period, quantity of catalase enzyme, total antioxidant capacity, fertilization, zygote development, were examined. Data were analyzed using one-way ANOVA in $SPSS_{19}$ software.

Results: The results of this study showed that administration of wheat germ oil in the carbamazepine-treated group significantly ($P < 0.05$) increased amount of the catalase, total antioxidant capacity, fertilization and zygote development in the laboratory.

***Conclusion*:** Wheat germ oil acts as an antioxidant agent and increases the amount of catalase, total antioxidant capacity and in vitro fertilization by reducing free radicals due to epilepsy and carbamazepine consumption.

***Keywords*:** Carbamazepine; Mice;Pentylenetetrazole; wheat germ oil; Zygote.

DOI: 10.29252/qums.13.11.24

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره سیزدهم، شماره دوازدهم، اسفند ۹۸
صفحه ۲۴ الی ۳۳
Archive of SID

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر حفاظتی روغن جوانه گندم بر استرس اکسیداتیو، لقاح آزمایشگاهی و تکوین زیگوت در موش‌های نر سوری صرعی‌شده تحت درمان با کاربامازپین

قدرت عبادی مناس[1*]، غلامرضا نجفی[2]

[1]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.

[2]گروه آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران.

***نویسنده مسئول مکاتبات:**
قدرت عبادی مناس؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:
g.ebadi@cfu.ac.ir,
ebadimanas@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: صرع یک بیماری شایع عصبی است که در اثر تخلیه‌های الکتریکی غیر طبیعی مکرر از مغز ایجاد می‌شود. برای درمان صرع از داروی کاربامازپین استفاده می‌گردد. این دارو با گذشت زمان موجب افزایش استرس اکسیداتیو و ناهنجاری‌های تولیدمثلی در بیماران می‌شود. روغن جوانه گندم بالاترین میزان ویتامین E را در میان سایر روغن‌های گیاهی دارد. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر روغن جوانه گندم به‌عنوان منبعی غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها بر استرس اکسیداتیو و لقاح آزمایشگاهی در موش‌های صرعی تحت درمان با کاربامازپین انجام شد.

روش بررسی: در این طرح آزمایشگاهی، ۴۰ موش سوری نر بالغ و ۲۰ موش سوری ماده بالغ با محدوده وزن بدنی ۳۰-۲۵ گرم مورد بررسی قرار گرفتند. موش‌های نر به چهار گروه ۱۰ نفره شامل: کنترل، گروه صرعی‌شده با پنتیلن تترازول با دوز ۴۰، پنتیلن تترازول + کاربامازپین با دوز ۱۸۰ و پنتیلن تترازول + کاربامازپین با دوز۱۸۰ + روغن جوانه گندم با دوز ۵۰۰ تقسیم شدند. موش‌های نر دوزهای مورد نظر را براساس گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۴۲ روز دریافت نمودند. در هر گروه از پنج موش ماده سالم جهت تخمک‌گیری استفاده شد. در پایان دوره آزمایش میزان آنزیم کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، لقاح و تکوین زیگوت در محیط آزمایشگاهی بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار SPSS ۱۹ تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که تجویز روغن جوانه گندم در گروه تحت درمان با کاربامازپین موجب افزایش معنادار ($P<۰/۰۵$) آنزیم کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، لقاح و تکوین زیگوت در آزمایشگاه گردید.

نتیجه‌گیری: روغن جوانه گندم به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدانی عمل نموده و از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد ناشی از بیماری صرع و مصرف کاربامازپین موجب افزایش آنزیم کاتالاز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و لقاح آزمایشگاهی می‌شود.

کلیدواژه‌ها: کاربامازپین؛ موش؛ پنتیلن تترازول؛ روغن جوانه گندم؛ زیگوت.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Ebadi Manas Gh, Najafi Gh. Protective Effects of Wheat Germ oil on the IVF, Oxidative Stress and In Vitro Zygote Development in Carbamazepine Treated Epileptic Male Mice. Qom Univ Med Sci J 2020;13(12):24-33. [Full Text in Persian]

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

مقدمه

ناباروری یک مشکل نسبتاً شایع است. طبق تعریف سازمان جهانی بهداشت، هرگاه زن و شوهری که در سنین باروری قرار دارند، ۱۲ ماه پس از ازدواج با وجود انجام فعالیت جنسی طبیعی و بدون استفاده از روش‌های پیشگیری بچه‌دار نشوند، نابارور نامیده می‌شوند. این اختلال تولیدمثلی موجب افزایش استرس بین زن و مرد می‌شود. در سطح جهانی، میزان شیوع ناباروری در کشورهای مختلف بین۳۰-۵ درصد متغیر می‌باشد. بر این اساس می‌توان گفت که بیش از ۸۰ میلیون فرد نابارور در جهان وجود دارد. در کشورهای شرقی، عوارض ناباروری نقش مهمی را در ایجاد بیماری روانی در اجتماع ایفا می‌کند. شایان ذکر است که سهم قابل توجهی از ناباروری مربوط به مردان می‌باشد (۱).

صرع یکی از مهم‌ترین اختلالات دستگاه عصبی مرکزی است که تقریباً ۰/۵ درصد از افراد جامعه به آن مبتلا می‌باشند (۲). تخمین زده می‌شود که در سراسر دنیا بیش از ۵۰ میلیون نفر به صرع مبتلا باشند (۳). اختلالات باروری معمولاً در زنان و مردان مبتلا به صرع شایع است (۴). باید خاطرنشان ساخت که در بیماران مبتلا به صرع، تشنج و داروهای ضد تشنج می‌توانند سیستم تولیدمثلی فرد را تخریب کنند. بیماری صرع و داروهای ضد صرع سیستم لیمبیک، هیپوتالاموس، هیپوفیز و غدد درون‌ریز محیطی را که بر سطح هورمون‌ها اثر می‌گذارند، هدف قرار می‌دهند. در حقیقت، محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گناد مشتق‌شده از کورتکس مغز، آمیگدال‌ها و هیپوکامپ در طول تشنج تغییر پیدا می‌کند (۵). اختلالات غدد درون‌ریز نه‌تنها باعث اختلال عملکرد تولیدمثلی می‌شوند؛ بلکه باعث تشدید صرع نیز خواهند شد. علاوه‌براین، داروهای ضد تشنج این پتانسیل را دارند که تعادل هورمون‌های تولیدمثل را در بدن مختل سازند (۶).

کاربامازپین دارویی است که معمولاً برای درمان بیماری صرع، دردهای ناشی از آسیب‌های نورونی و اختلالدوقطبی استفاده می شود .(۴) این دارو از نظر شیمیایی، محلول در چربی خنثی بوده و از سد خونی -مغزی و غشاهای دیگر بدن عبور می‌کند .(۷) داروهای ضد صرع بر محور هیپوتالاموس -هیپوفیز -گناد نیز اثراتی دارند که ممکن است به اختلالات غدد درون‌ریز تولیدمثلی منجر شود(۸،۹) داروهای ضد تشنج از جمله کاربامازپین باعث افزایش سطح گلوبولین متصل‌شونده به هورمون‌های جنسی (Sex Hormone Binding Globulin :SHBG) و در نتیجه تحریک آنزیم آروماتاز و سیتوکروم P۴۵۰شده و موجب کاهش سطح تستوسترون می‌گردد. کاهش سطح تستوسترون نیز منجر به اختلال عملکرد جنسی در مردان مبتلا به صرع پس از درمان طولانی مدت با کاربامازپین می‌شود (۱۰).

سلول‌هایی که در معرض استرس اکسیداتیو قرار می‌گیرند، یا آسیب را ترمیم می‌کنند و یا استرس اکسیداتیو را به وسیله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز) و غیر آنزیمی (مانند ویتامین E و C و فلاونوئیدها) کاهش می‌دهند. این آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی با عوامل ایجادکننده استرس از جمله رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species :ROS) واکنش نشان داده و آن‌ها را غیر فعال می‌کنند (۱۱).

روغن جوانه گندم غنی از ویتامین‌های A، D، E، B_1، B_2، B_3، B_6 و اسیدهای چرب غیر اشباع مانند اولئیک اسید، لینولئیک اسید و آلفا لینولئیک اسید می‌باشد (۱۲). آلفا لینولئیک اسید موجود در روغن جوانه گندم با کاهش تولید O_2^- و فعالیت NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) اکسیداز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهد (۱۳). مصرف روغن جوانه گندم توسط موش‌ها باعث افزایش ویتامین E در اندام‌های آن‌ها شده و مقاومت آنتی‌اکسیدانی این اندام‌ها و بافت‌ها را افزایش می‌دهد (۱۴). از سوی دیگر، ترکیبات فنلی موجود در روغن جوانه گندم با مهار سیتوکروم P۴۵۰ موجب کاهش رادیکال‌های آزاد می‌شوند (۱۵). با توجه به اینکه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در روغن جوانه گندم باعث کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌ها می‌شوند، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی روغن جوانه گندم بر لقاح آزمایشگاهی، تکوین زیگوت و کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های سوری صرعی‌شده تحت درمان با کاربامازپین انجام شد.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

روش بررسی

در این مطالعه از ۴۰ موش سوری نر در محدوده وزنی ۳۰-۲۵ گرم و ۲۰ موش سوری ماده غیر آبستن و بالغ جهت تخمک‌گیری استفاده گردید.

موش‌ها تحت شرایط استاندارد ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در اتاقی با دمای ۲۳-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. موش‌ها طی فرایند مطالعه به‌طور آزاد به آب و غذا دسترسی داشتند. باید خاطرنشان ساخت که پژوهش حاضر در آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۸ انجام شد و تمام موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی) در آن رعایت گردید. حیوانات نر به‌صورت تصادفی در چهار گروه ۱۰ نفره به شرح زیر قرار گرفتند:

- گروه کنترل داروی نرمال سالین را به‌صورت خوراکی دریافت کردند.
- گروه صرع داروی پنتیلن تترازول را با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت درون صفاقی دریافت نمودند.
- گروه صرع + کاربامازپین که پنتیلن تترازول را با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کاربامازپین را با دوز ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند.
- گروه صرع + کاربامازپین + روغن جوانه گندم که پنتیلن تترازول با دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، کاربامازپین با دوز ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و روغن جوانه گندم با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را دریافت نمودند.

همه موش‌های نر به مدت ۴۲ روز تحت بررسی و آزمایش قرار گرفتند. برای ایجاد کیندلینگ شیمیایی، پنتلین تترازول به مقدار ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در نرمال سالین حل شد و به‌صورت درون صفاقی، هر ۴۸ ساعت یک بار طی ۱۳ نوبت به موش‌ها تزریق گردید و پاسخ تشنجی حیوان به مدت ۲۰ دقیقه مشاهده شد (۱۶). رفتار تشنجی حاصل از تزریق پنتلین تترازول براساس معیارهای زیر طبقه‌بندی گردید (۱۷): مرحله صفر: بدون پاسخ؛ مرحله یک: انقباض عضلات صورت و گوش‌ها؛ مرحله دو: انتشار موج انقباضی به سراسر بدن؛ مرحله سه: پرش‌های میوکلونیک و ایستادن روی دو پا؛ مرحله چهار: حملات تونیک کلونیک و افتادن به پهلو؛ مرحله پنج: افتادن به پشت و حملات تونیک کلونیک عمومی. در این مطالعه تزریق ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتلین تترازول موجب القای تشنج گردید؛ به‌طوری که موش‌هایی که فقط پنتیلن تترازول دریافت کرده بودند، تمام معیارهای ذکرشده را نشان دادند و تا مرحله پنج پیش رفتند. شایان ذکر است که در پژوهش حاضر فقط از حیوانات کیندلینگ کامل که در سه تزریق متوالی مراحل چهار و پنج تشنج را نشان دادند، استفاده گردید. در این مطالعه جهت کنترل و درمان صرع از کاربامازپین بهره گرفته شد. در این ارتباط، برای جبران عوارض کاربامازپین از روغن جوانه گندم استفاده شد. بدین شکل که این روغن همراه با کاربامازپین به‌صورت گاواژ و به‌طور خالص به مدت ۴۲ روز به موش‌ها داده شد. در انتهای دوره آزمایش، موش‌های سوری به مدت ۱۲ ساعت از غذا محروم گردیدند. در مرحله بعد، موش‌ها با استفاده از تزریق داخل صفاقی کتامین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند و در ادامه از طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی، آسان‌کشی گردیدند. سپس قسمت تحتانی شکم حیوانات به روش برش جراحی شکافته شد و اپیدیدیم و بیضه هر دو قسمت چپ و راست از بدن آن‌ها خارج گردید.

اندازه‌گیری میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیضه

برای اندازه‌گیری اثرات کاربامازپین و روغن جوانه گندم بر استرس اکسیداتیو، ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی گروه کنترل و تجربی اندازه‌گیری گردید. قدرت آنتی‌اکسیدانی کل بیضه از طریق اندازه‌گیری کاهش قدرت احیاکنندگی آزمون فریک (Freak) مشخص می‌شود (۱۸).

در مطالعه حاضر با استفاده از این روش در PH پایین که توسط استات بافر ایجاد شده بود، اثر احیاشوندگی کمپلکس Fe^{III}-TPTZ به فرم فروس مورد سنجش قرار گرفت (کمپلکس در مجاورت استات بافر، رنگ آبی ایجاد می‌کند). در پژوهش حاضر به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هموژن بافت، ۳ میلی‌لیتر معرف FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) اضافه گردید و به مدت ۱۰-۷ دقیقه انکوبه شد. در ادامه، جذب کمپلکس آبی رنگ در ۵۹۳ نانومتر اندازه‌گیری گشت (۱۹).

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت بیضه

در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم کاتالاز براساس توانایی آن در تجزیه H_2O_2 در بافت هموژنیزه‌شده بیضه به روش Aebi تعیین گردید. شایان ذکر است که تجزیه H_2O_2 با کاهش جذب در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر قابل بررسی می‌باشد. برای این منظور از پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی‌مولار به‌عنوان سوبسترا و از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (PH=۷) به‌عنوان جایگزین سوبسترا در محلول بلانک استفاده شد. محلول سنجش حاوی ۲ میلی‌لیتر محلول هموژنای بافتی و ۱ میلی‌لیتر محلول پراکسید هیدروژن بود. واکنش با افزودن H_2O_2 آغاز شد و کاهش در جذب به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳۰ ثانیه بررسی گردید. در پایان، مقادیر بر حسب واحد بر گرم بافت بیان شدند (۲۰).

بررسی قابلیت باروری آزمایشگاهی

آماده‌سازی اسپرم‌ها برای باروری آزمایشگاهی

برای تهیه اسپرم موش‌های نر، موش‌ها ابتدا توسط کتامین و زایلازین بیهوش گردیده و از طریق جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند. سپس پوست ناحیه شکمی با اتانول ۷۰ درصد استریل گردید. در ادامه، شکم حیوان باز گشته و دم اپیدیدیم برداشته شد. پس از ایجاد چند برش، دم اپیدیدیم در لوله استریل حاوی ۱ سی‌سی محیط کشت HTF (Human tubal fluid) با ترکیب ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر BSA(serum albumin Bovine) که قبلاً جهت تعادل در انکوباتور ۳۷ درجه گذاشته شده بود، قرار گرفت. برای خروج اسپرم‌ها، دم اپیدیدیم داخل محیط کشت در انکوباتور دارای Co_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه، اسپرم‌ها وارد محیط کشت شدند.

روش تخمک‌گیری و لقاح

موش‌های ماده جهت گرفتن اووسیت بالغ تحت تحریک تخمدانی قرار گرفتند.

جهت انجام این مطالعه، تزریق ۱۰ واحد هورمون PMSG (Pregnant Mare serum Gonadotropin) (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر و ۴۸-۴۶ ساعت بعد تزریق ۱۰ واحد HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (ساخت شرکت Folligon، هلند) به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر به روش داخل صفاقی صورت گرفت. شایان ذکر است که تخمک‌گذاری معمولاً ۱۲-۱۰ ساعت پس از تزریق HCG صورت می‌گیرد. پس از گذشت ۱۴-۱۲ ساعت از تزریق HCG، موش‌های ماده به روش آسان‌کشی کشتار شدند. پس از برش پوست شکم، بخش آمپولای اویداکت آن‌ها جدا گردید و در پتری دیش حاوی ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم HTF + BSA قرار داده شد. اووسیت‌ها همراه با توده‌های سلولی کومولوسی از مجرای داخل اویداکت خارج گشته، مورد شستشو قرار گرفتند و در محیط کشت جدید جای داده شدند. اسپرم‌های ظرفیت‌یابی‌شده به تعداد 1×10^6 عدد به قطرات لقاح حاوی ۱۵-۱۰ تخمک شستشویافته انتقال داده شدند. برای انجام فرایند لقاح، ظرف‌های پتری دیش در انکوباتوری با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد Co_2 قرار داده شدند. عمل لقاح حدود ۶-۴ ساعت پس از اضافه‌کردن اسپرم‌ها با مشاهده دو پیش‌هسته نر و ماده با استفاده از میکروسکوپ اینورت صورت گرفت. تمامی قطرات توسط روغن معدنی پوشیده گردیدند. پس از لقاح، زیگوت‌ها سه بار با محیط کشت KSOM (Potassium simplex optimized medium) شستشو داده شده و در محیط کشت جدید KSOM جای گرفتند. سپس برای ادامه رشد زیگوت‌ها، پتری دیش‌ها به مدت پنج روز داخل انکوباتور قرار داده شدند.

ارزیابی رشد جنین‌ها

پس از مرحله لقاح، درصد تخمک‌های لقاح‌یافته به‌دست آمد. پس از ۲۴ ساعت، درصد جنین‌هایی که از تخمک‌های بارورشده به مرحله دو سلولی رسیده بودند، محاسبه گردید. پس از گذشت ۵-۴ روز، درصد بلاستوسیست‌های ایجادشده از جنین‌های دو سلولی محاسبه شد (۲۱).

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 و آزمون‌های One Way ANOVA و توکی تجزیه و تحلیل گردیدند.

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

سطح معناداری معادل (P<۰/۰۵) در نظر گرفته شد و داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار بیان گردیدند.

یافته‌ها

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

ارزیابی نمونه‌های بافتی نشان داد که گروه‌های صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین سبب کاهش معنادار (P<۰/۰۵) فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با گروه کنترل و کنترل صرعی شده‌اند. اگرچه فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه کنترل صرعی کاهش یافته بود؛ اما این کاهش نسبت به گروه کنترل معنادار نبود (P>۰/۰۵). در این مطالعه گروه صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین به همراه روغن جوانه گندم باعث افزایش آنزیم کاتالاز شد؛ به‌طوری که در مقایسه با گروه صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین، اختلاف معناداری (P<۰/۰۵) مشاهده گردید. از سوی دیگر، اگرچه گروه صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین با دوز ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به همراه روغن جوانه گندم باعث افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شد؛ اما بین این گروه با گروه کنترل اختلاف معناداری (P<۰/۰۵) مشاهده نگردید (جدول ۱).

میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (FRAP)

ارزیابی نمونه‌های بافتی نشان داد که گروه‌های صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین سبب کاهش معنادار (P<۰/۰۵) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نسبت به گروه کنترل و کنترل صرعی شده‌اند. گروه کنترل صرعی نیز موجب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نسبت به گروه کنترل شد؛ اما این کاهش معنادار نبود (P>۰/۰۵). در این مطالعه گروه‌های صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین به همراه روغن جوانه گندم سبب افزایش معنادار (P<۰/۰۵) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با گروه‌های صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین شدند؛ به‌طوری که بین این گروه‌ها با گروه‌های کنترل و کنترل صرعی، اختلاف معناداری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول شماره ۱: میانگین داده‌های کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌دست‌آمده در گروه کنترل و گروه‌های آزمایش

گروه‌ها	کاتالاز (واحد بر گرم بافت)	FRAP (میلی‌مول بر گرم بافت)
کنترل	۰/۶۲۶±۰/۰۲۴	۴۵/۳۹±۲/۳۸
کنترل صرعی‌شده	۰/۵۴۶±۰/۰۱۸	۳۸/۰۳±۱/۵۳
صرعی + کاربامازپین	۰/۲۱۲±۰/۰۱۰[a]	۱۰/۴۲±۱/۹۱[a]
صرعی + کاربامازپین + روغن جوانه گندم	۰/۵۳۴±۰/۰۱۸	۳۶/۹۹±۱/۷۴

میانگین داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده است. a نشان‌دهنده اختلاف معنادار در هر ستون بین گروه صرعی + کاربامازپین با گروه‌های کنترل، کنترل صرعی‌شده و گروه صرعی + کاربامازپین + روغن جوانه گندم می‌باشد.

ارزیابی درصد لقاح

پس از جمع‌آوری تخمک‌ها از موش‌های ماده، تخمک‌های بارورشده توسط اسپرم‌های ظرفیت‌یافته، سلول تخم را به وجود آوردند. بر مبنای نتایج، میانگین درصد لقاح و تشکیل تخم، بلاستوسیست و جنین‌های هچ‌شده در گروه صرعی‌شده نسبت به گروه کنترل کاهش یافت؛ اما این کاهش معنادار نبود (P>۰/۰۵).

علاوه‌براین، نتایج حاکی از آن بودند که مصرف داروی کاربامازپین در موش‌های صرعی موجب کاهش معنادار (P<۰/۰۵) درصد لقاح و تشکیل تخم، بلاستوسیست و جنین‌های هچ‌شده نسبت به گروه کنترل و گروه صرعی‌شده گردیده است. همچنین مشاهده گردید که مصرف روغن دانه گندم در موش‌های تحت درمان با کاربامازپین موجب افزایش معنادار (P<۰/۰۵) درصد لقاح و تشکیل تخم، بلاستوسیست و جنین‌های هچ‌شده نسبت به گروه تحت درمان با کاربامازپین شده است. نتایج مربوط به درصد جنین‌های دو سلولی در تمامی گروه‌های مورد آزمایش، اختلاف معناداری (P>۰/۰۵) را نشان ندادند (جدول ۲ و شکل ۱).

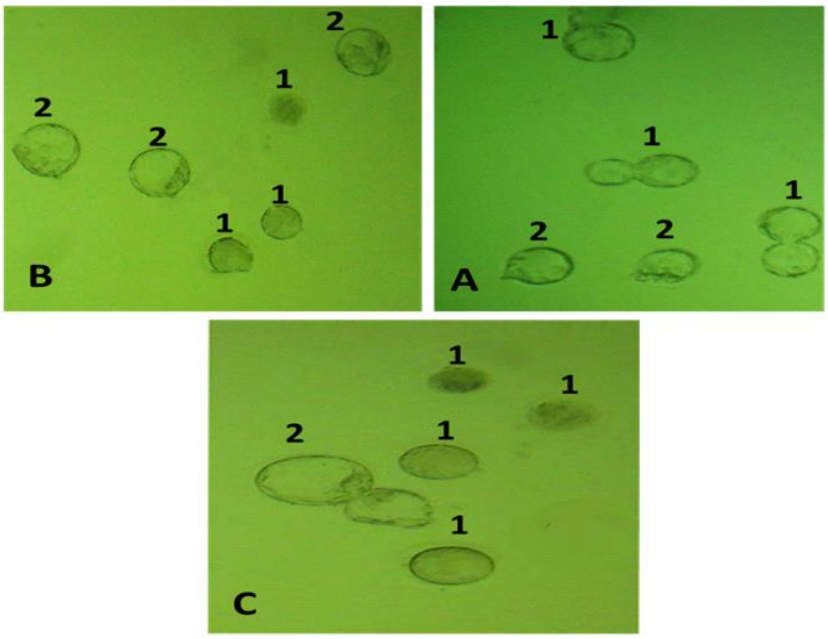
www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

جدول شماره ۲: درصد زیگوت، جنین‌های دو سلولی، بلاستوسیست و جنین‌های هچ‌شده در گروه کنترل و گروه‌های آزمایش

گروه‌ها	زیگوت (درصد)	جنین دو سلولی (درصد)	بلاستوسیست (درصد)	جنین‌های هچ‌شده (درصد)
کنترل	۹۲/۸۷±۲/۱۵	۸۹/۰۰±۳	۶۸/۷۵±۴/۵۵	۵۲/۷۷±۲/۲۷
کنترل صرعی‌شده	۸۶/۵۲±۵/۲۷	۸۵/۵۴±۱/۶۲	۶۳/۷۵±۳/۲۵	۴۲/۲۵±۳/۱۰
صرعی + کاربامازپین	۳۶/۱۰±۴/۹۰[a]	۶۶/۰۱±۵/۲۳	۳۰/۷۲±۱/۷۸[a]	۲۲/۸۳±۲/۳۳[a]
صرعی + کاربامازپین + روغن جوانه گندم	۶۸/۳۳±۶/۱۷	۷۸/۵۵±۸/۱۰	۵۲/۹۱±۲/۷۵	۴۱/۲۷±۱/۸۳

میانگین داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شده است. a نشان‌دهنده اختلاف معنادار در هر ستون بین گروه صرعی + کاربامازپین با گروه‌های کنترل، کنترل صرعی‌شده و گروه صرعی + کاربامازپین + روغن جوانه گندم می‌باشد.



شکل شماره ۱: تصاویر لقاح آزمایشگاهی در موش‌های مورد آزمایش

A (گروه کنترل): ۱. جنین‌های در حال هچ‌شدن، ۲. جنین‌های در مرحله بلاستوسیست

B (گروه صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین): ۱. اووسیت‌های بارورنشده، ۲. جنین‌های در مرحله بلاستوسیست

C (گروه صرعی دریافت‌کننده کاربامازپین + روغن جوانه گندم): ۱. جنین‌های بارورنشده، ۲. جنین در حال هچ‌شدن (بزرگنمایی x۲۰۰)

بحث

بیماری صرع به‌طور خودکار بر تولیدمثل اثر گذاشته و سطح هورمون‌ها و عملکرد تولیدمثلی را در انسان و حیوان تغییر می‌دهد (۲۲). همچنین صرع از طریق تجزیه پروتئین‌ها باعث تولید و انتشار گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله سوپراکسید و NO در سلول‌ها می‌گردد؛ این مولکول‌ها با آسیب‌زدن به چربی‌ها و پروتئین‌های سلول باعث افزایش استرس اکسیداتیو می‌شوند (۲۳). علاوه‌براین، مصرف طولانی‌مدت داروهای ضد صرع از جمله کاربامازپین با تولید رادیکال‌های آزاد و ROS موجب افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۵،۲۴).

با توجه به اینکه روغن جوانه گندم حاوی انواع مولکول‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد، مصرف همزمان آن با داروی کاربامازپین می‌تواند موجب کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود توان تولیدمثلی شود. با توجه به موارد بیان‌شده، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی روغن جوانه گندم بر لقاح آزمایشگاهی، تکوین زیگوت و استرس اکسیداتیو در موش‌های سوری صرعی‌شده تحت درمان با کاربامازپین انجام شد.

نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند که در گروه صرعی و همچنین

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

گروه‌های صرعی تحت درمان با کاربامازپین، فعالیت آنزیم کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با گروه کنترل به شکل معناداری کاهش یافته است؛ با این تفاوت که بیشترین کاهش مربوط به گروه‌های صرعی تحت درمان با کاربامازپین بود؛ اما میزان آنزیم کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سلول در گروه تحت درمان با کاربامازپین که روغن جوانه گندم مصرف کرده بودند، نسبت به گروهی که فقط تحت درمان با کاربامازپین بودند، به شکل معناداری افزایش یافته بود. بیماری صرع و مصرف طولانی‌مدت داروهای ضد صرع موجب افزایش رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود و به دنبال آن میزان آنزیم کاتالاز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سلول کاهش یافته و استرس اکسیداتیو در سلول افزایش می‌یابد؛ زیرا کاتالاز آنزیمی است که مسئول سم‌زدایی H_2O_2 تولیدشده توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌باشد. روغن جوانه گندم از طریق آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (پراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز) و غیر آنزیمی (ویتامین E و C، فلاونوئیدها و غیره) خود، رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را پاک‌سازی نموده و میزان استرس اکسیداتیو سلول را کاهش می‌دهد. علاوه‌براین، روغن جوانه گندم حاوی چندین اسید چرب اشباع نشده و اشباع‌شده است (۲۷،۲۶). از میان این اسیدهای چرب، اسید آلفا لینولنیک به دلیل اثر ضد التهابی آن باعث کاهش تولید O_2^- و فعالیت NADPH اکسیداز می‌شود؛ در نتیجه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (۲۸،۴). از سوی دیگر، روغن جوانه گندم دارای بالاترین میزان توکوفرول در بین سبزیجات و روغن‌ها به‌ویژه بالاترین میزان آلفا- توکوفرول (ویتامین E) است که نشان‌دهنده ۶۰ درصد از میزان کل آن می‌باشد. ویتامین E یک ماده آنتی‌اکسیدان قوی است که از طریق مهار مستقیم رادیکال‌های سمی از بافت‌ها در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند (۳۰،۲۹). در این راستا، Sudha و همکاران در پژوهشی بیان نمودند که بیماری صرع باعث کاهش آنزیم کاتالاز می‌شود (۳۱). Arora و همکاران نیز گزارش نمودند که فعالیت آنزیم کاتالاز در بیماران صرعی‌شده با پنتلین تترازول و نیز بیماران تحت درمان با کاربامازپین کاهش می‌یابد (۳۲) که این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر مغایرت دارند.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر حاکی از آن بودند که داروی کاربامازپین سبب کاهش درصد لقاح، درصد جنین‌های دو سلولی، بلاستوسیست‌ها و کاهش تعداد جنین‌های هچ‌شده در مقایسه با گروه کنترل شده است. همچنین گروه‌های صرعی که روغن جوانه گندم و کاربامازپین را همزمان دریافت کرده بودند، باعث افزایش درصد لقاح، درصد بلاستوسیست‌ها، درصد جنین‌های دو سلولی و درصد جنین‌های هچ‌شده در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کاربامازپین نشان دادند. این بهبود را می‌توان به ویژگی آنتی‌اکسیدانی روغن جوانه گندم نسبت داد و گفت با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سرشاربودن این روغن از ویتامین E، سبب کاهش استرس اکسیداتیو شده است که این کاهش خود منجر به افزایش درصد لقاح و بلاستوسیست‌ها گردیده است. در این راستا، در پژوهشی نشان داده شد که نرخ لقاح در مردانی که قبل از IVF (In Vitro Fertilization) ویتامین E مصرف کرده‌اند، در مقایسه با سایرین افزایش یافته است (۳۳). ویتامین E یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌باشد (۳۴) که نقش حمایتی آن در کیفیت و کمیت اسپرم، لقاح و باروری انسان‌ها گزارش شده است (۳۶،۳۵).

در انتها، در ارتباط با محدودیت‌های پژوهش حاضر باید گفت که در این مطالعه اثر حفاظتی روغن جوانه گندم بر موش‌های نر مورد بررسی قرار گرفت؛ از این رو نتایج آن قابل تعمیم به موش‌های ماده نمی‌باشد. از سوی دیگر، نتایج این مطالعه قابل تعمیم به موش‌های نژاد Balb/c بوده و در صورت نیاز و تعمیم به سایر نژادها لازم است این کار با احتیاط و دانش کافی صورت بگیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند که بیماری صرع و داروی کاربامازپین با افزایش استرس اکسیداتیو در بدن موجب کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و توان تولیدمثلی می‌شود؛ اما روغن جوانه گندم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان می‌تواند از تغییرات اندوکرینی خاص حاصل از بیماری صرع و داروی کاربامازپین که عملکرد سیستم تولیدمثلی را مختل می‌کنند، جلوگیری نماید.

www.SID.ir
International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در آزمایشگاه جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شد.

پژوهشگران بر خود لازم می‌دانند از مسئول محترم آزمایشگاه؛ جناب آقای کریمی که در راستای انجام کارهای عملی و هماهنگی‌های لازم محققان را همراهی نمود، تشکر و قدردانی نمایند.

References:

1. Olayemi FO. A review on some causes of male infertility. Afr J Biotechnol 2010;9:2834-42. Link

2. Sander JW, Shorvon SD. Epidemiology of the epilepsies. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1996;61(5):433-43. PMID: 8965090

3. Banerjee PN, Filippi D, Allen HW. The descriptive epidemiology of epilepsy - a review. Epilepsy Res 2009;85(1):31-45. Link

4. Al Snafi AE, Al Salih RM, Abbas AM. Endocrine reproductive effects of antiepileptic drugs in male rats. Global J Pharmacol 2013;7(1):95-8. Link

5. Herzog AG. Disorders of reproduction in patients with epilepsy: primary neurological mechanisms. Seizure 2008;17(2):101-10. PMID: 18165118

6. Richen A. Safety of lamotrigine. Epilepsia 1994;35(5):37-40. PMID: 8039469

7. Afshar M, Moallem SA, Baharara J, Takjo T, Golalipour MJ. Preventive effect of vitamin B6 on developmental toxicity of carbamazepine in mice. Iran J Basic Med Sci 2011;14(2):99-106. Link

8. Isojarvi JI, Laatikainen TJ, Pakarinen AJ, Juntunen KT, Myllyla VV. Polycystic ovaries and hyperandrogenism in women taking valproate for epilepsy. N Engl J Med 1993;329(19):1383-8. PMID: 8413434

9. Isojarvi JI, Pakarinen AJ, Myllyla VV. Effects of carbamazepine therapy on serum sex hormone levels in male patients with epilepsy. Epilepsia 1988;29(6):781-6. PMID: 3191895

10. Backstrom T, Gee KW, Lan N, Sorensen M, Wahlstrom G. Steroids in relation to epilepsy and anaesthesia. Ciba Found Symp 1990;153:225-30. PMID: 2292214

11. Abd-El-Hameed AM, Soliman HA, El-Reheem EA. Protective role of wheat germ oil in clozapine-induced oxidative stress and biochemical alterations in liver of male albino rats. J Am Sci 2013;9(1):268-274. Link

12. Irmak S, Dunford NT. Policosanol contents and compositions of wheat varieties. J Agric Food Chem 2005;53(14):5583-6. PMID: 15998118

13. Alessandri JM, Extier A, Al-Gubory KH, Harbeby E, Lallemand MS, Linard A. Influence of gender on DHA synthesis: the response of rat liver to low dietary α-linolenic acid evidences higher ω3 Δ4-desaturation index in females. Eur J Nutr 2012;51(2):199-209. PMID: 21647669

14. Megahed MG. Study on stability of wheat germ oil and lipase activity of wheat germ during periodical storage. Agric Biol JN Am 2011;2(1):163-8. Link

15. Niu LY, Jiang ST, Pan LJ. Preparation and evaluation of antioxidant activities of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation. J Food Sci Technol 2013;50(1):53-61. PMID: 24425887

16. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. motor seizure. Electroenceph Clin Neurophysiol 1972;32(3):281-94. PMID: 4110397

17. Becker A, Grecksch G, Ruthrich HL, Pohle W, Marx B, Matthies H. Kindling and its consequences on learning in rats. Behav Neural Biol 1992;57(1):37-43. PMID: 1567332

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0

Archive of SID

18. Crotty KL, May R, Kulvicki A, Kumar D, Neal DE Jr. The effect of antimicrobial therapy on testicular aspirate flow cytometry. J Urol 1995;153(3 Pt 1):835-8. PMID: 7861548

19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193(1):265-75. PMID: 14907713

20. Aebi H. Catalse in vitro. Methods Enzymol 1984;105:121-6. PMID: 6727660

21. Hedrich H. The laboratory mouse: handbook of experimental animals. 2nd ed. New York: Academic Press; 2006. P. 439-46. Link

22. Edwards HE, Burnham WM, Mendonca A, Bowlby DA, MacLusky NJ. Steroid hormones affect limbic after discharge thresholds and kindling rates in adult female rats. Brain Res 1999;838(1):136-50. Link

23. Rodrigues AD, Scheffel TB, Scola G, Dos Santos MT, Fank B, Dani C, et al. Purple grape juices prevent pentylenetetrazol-induced oxidative damage in the liver and serum of Wistar rats. Nutr Res 2013;33(2):120-5. PMID: 23399662

24. Santhrani T, Maheswari E, Saraswathy GR. Carbamazepine provoked hepatotoxicity: attenuation by vitamin C. Oxid Antioxid Med Sci 2013;2(1):37-43. Link

25. Lorigados Pedre L, Gallardo JM, Morales Chacón LM, Vega García A, Flores-Mendoza M, Neri-Gómez T, et al. Oxidative stress in patients with drug resistant partial complex seizure. Behav Sci 2018;8(6):59. PMID: 29890748

26. Zacchi P, Daghero J, Jaeger P, Eggers R. Extraction/fractionation and deacidification of wheat germ oil using supercritical carbon dioxide. Braz J Chem Eng 2006;23(1):105-10. Link

27. Eisenmenger M, Dunford NT. Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. J Am Oil Chem Soc 2008;85(1):55-61. Link

28. Nejati V, Rahimpour V. The combined effect of wheat germ oil and carbamazepine on the improvement of learning and spatial memory of epileptic mice. Qom Univ Med Sci J 2017;11(5):16-28. Link

29. El-Marasy SA, El-Shenawy SM, El-Khatib AS, El-Shabrawy OA, Kenawy SA. Effect of Nigella sativa and wheat germ oils on scopolamine induced memory impairment in rats. Bull Facul Pharm Cairo Univ 2012;50(2):81-8. Link

30. Kiasalari Z, Khalili M, Shafiee S, Roghani M. The effect of Vitamin E on learning and memory deficits in intrahippocampal kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. Indian J Pharmacol 2016;48(1):11-4. PMID: 26997715

31. Sudha K1, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. Clin Chim Acta 2001;303(1-2):19-24. PMID: 11163018

32. Arora T, Mehta AK, Sharma KK, Mediratta PK, Banerjee BD, Garg GR, et al. Effect of carbamazepine and lamotrigine on cognitive function and oxidative stress in brain during chemical epileptogenesis in rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2010;106(5):372-7. PMID: 20002063

33. Rodriguez H. About hethir rodriguez-certified herbalist, nutritionist. Natural Fertility Company. Available at: URL: https://natural-fertility-info.com/hethir-rodriguez; 2007. Link

34. 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. J Chem Neuroanat 2005;29(3):173-8. PMID: 15820619

35. Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V, Ghaffari Novin M. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. Iran J Reprod Med 2008;6(2):1-5. Link

36. Ahmadi E, Nejati V, Najafi G, Khezri S. Protective effect of wheat germ oil on sex hormones disorders and uterine tissue disorders morphology following treatment with carbamazepine in epileptic female mice with pentylenetetrazol. J Fasa Univ Med Sci 2015;5(1):142-54. Link

www.SID.ir

International License Creative Commons Attribution License 4.0