اثرات بذر کتان بر اووژنز و بافت تخمدان موش بالغ نژاد NMRI در شرایط In vivo و In vitro

معظمه خوش روش[۱]، نسیم حیاتی رودباری[۱*]، مرجان صباغیان[۲]، کاظم پریور[۱]

۱ـ گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲ـ پژوهشگاه رویان، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، گروه آندرولوژی، تهران، ایران
* مسئول مکاتبات: nasimhayati@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۳

چکیده

استفاده از بذر کتان در رژیم غذایی انسان در سراسر جهان افزایش یافته است. با این حال برای استفاده از بذر کتان به عنوان یک غذای عملکردی لازم است عوارض جانبی ترکیبات آن که روی باروری انسان اثر می‌گذارد مورد بررسی قرارگیرد. به همین علت در این مطالعه اثربذر کتان، روی دستگاه تناسلی موش‌های ماده، بررسی گردید. تحقیق حاضر در دو شرایط in vivo وin vitro انجام گرفت. موش‌ها در شرایط In vivo به مدت ۱۴ روز در گروه‌های کنترل باغذای معمولی و شم با دریافت ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و سه گروه تجربی محلول بذر کتان را به صورت گاواژ در غلظت‌های ۳/۳۳، ۱۶/۶۶ و ۳۳/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دریافت کردند. تشریح در روز ۱۵ انجام شد. سپس مطالعات بافت شناسی روی تخمدان گروه‌های کنترل، شم و تجربی‌ها انجام شد. در شرایط In vitro نیز تخمدان‌ها در شرایط استریل به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند، سپس تحت بررسی قرار گرفتند. افزایش معنادار در تعداد و قطر فولیکول-های بدوی، تعداد فولیکول‌های اولیه، تعداد فولیکول‌های آتروفیه شده، تعداد جسم زرد، کاهش معنادار در وزن جانور، تعداد فولیکول‌های ثانویه، تعداد و قطر فولیکول‌های گراف، قطر فولیکول‌های اولیه، قطرفولیکول‌های گراف، قطر جسم زرد در شرایط In vivo مشاهده شد. در شرایط In vitro نیز تعداد فولیکول‌های آتروفیه شده در اثربذر کتان افزایش یافت. نتایج بدست آمده از بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق، حاکی از اثرات منفی بذر کتان روی اووژنز و بافت تخمدان بود که اثر ضد باروری داشته وباید قبل و هنگام بارداری، با احتیاط بیشتری مصرف شود.

کلمات کلیدی: بذر کتان، تخمدان، موش، بارداری

مقدمه

با توجه به اینکه اطلاعات جامعی در مورد خطرات مصرف داروهای گیاهی در طی بارداری در دسترس نمی‌باشد، اما کماکان محققین معتقدند باید مصرف داروهای گیاهی در دوران بارداری ممنوع شود. انجمن تراتولوژی امریکا توصیه می‌کند زنان باردار از مصرف داروهای گیاهی در دوران بارداری اجتناب کنند [۱۸]. مقاله‌ای مروری در ارتباط با اهمیت بالقوه گیاهان به عنوان منابع مواد و ترکیبات ضدبارداری، دانه کتان را دارای قابلیت ایجاد سقط جنین و قاعده‌آور معرفی کرده است [۷]. گیاه کتان با نام علمی *Linum usitatissimum* L. گیاهی از شاخه ماگنولیوفیت‌ها است. گیاهی یک ساله، دیپلوئید، علفی با ساقه برافراشته سبز به ارتفاع ۲۰ تا ۵۰ گاهی تا ۱۰۰ سانتی-متر با برگ‌های متناوب خطی و خطی سر نیزه‌ای است [۲]. دارای کپسول ۱۰ حجره‌ای کروی‌شکل حاوی دانه‌ها به طول ۵ و به عرض ۳/۵ میلی‌متر در دو رنگ قهوه‌ای و زرد طلایی است [۳]. اجزای تشکیل دهنده بذر کتان شامل روغن (۳۶

درصد)، پروتئین (۲۴ درصد) و فیبر (۳۲ درصد) است [۷]. بذر کتان منبع غنی فیتواستروژن، N-3 اسید چرب، اسید لینولنیک (ALA) و سکوایزولاریسیریک دی‌گلوکوزید (SDG) است. SDG یک پیش ماده لیگنان است که فلور باکتریایی روده بزرگ انسان آن را به دو لیگنان بزرگ انترودیول و انترولاکتون تبدیل می‌کند. غلظت لیگنان در بذر کتان بیش از ۱۰۰ برابر بیشتر از سایر مواد غذایی است [۲۲]. بذر کتان با نام علمی ***Linum usitatissimum*** به دلیل اثرات و قدرت پیشگیری از فعالیت بیماری‌ها در رژیم غذایی انسان یافت می‌شود [۱۱]. استفاده روزانه از فیبر دانه کتان، اسیدهای آلفالینولنیک و لیگنان‌های آن چندین خواص درمانی از بذر کتان را فراهم می‌کند [۵، ۶]. اما به دلیل وجود فیتواستروژن می‌تواند سبب ایجاد ناباروری شود. این احتمال وجود دارد که مصرف بذر کتان در سنین باروری ممکن است افزایش یابد و احتمالاً نتایجی در این افزایش مصرف در طول بارداری به وجود آورد. در حالی که اثر استروژن‌ها روی جنین در حال رشد به خوبی ثابت شده است [۲۳]. حدود ۶۵ درصد از نواقصی که هنگام تولد دیده می‌شود ناشناخته است [۱۸]. از آنجا که در نقایص هنگام تولد مواد شیمیایی و رژیم غذایی طبیعی نقش عمده‌ای در علل آنها می‌تواند داشته باشد، مواد غذایی حاوی فیتواستروژن به طور قابل توجهی می‌تواند باروری را تحت تأثیر قرار دهد.

مواد و روش کار

مراحل In vivo: در این تجربیات از موش سفید آزمایشگاهی ماده‌ی بالغ نژاد NMRI به عنوان حیوان مورد آزمایش استفاده شده است. موش‌های ماده با وزن ۳۰-۲۸ گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری و به اتاق نگهداری حیوانات انتقال داده شدند و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرارگرفتند. تغذیه حیوانات از پلت‌های آماده و مخصوص صورت گرفت و آب مورد استفاده، آب لوله کشی شهر تهران بوده که توسط شیشه‌های مخصوصی در اختیار جانوران قرار می‌گرفت. درجه حرارت اتاق نگهداری حیوانات ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد بود.

در این مرحله موش‌ها به سه گروه تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل: بدون دریافت بذر کتان

۲. گروه شم (شاهد): دریافت‌کننده ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به عنوان حلال بذر کتان از طریق گاواژ به مدت ۱۴ روز

۳. گروه تجربی۱: دریافت‌کننده ۳/۳۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش از بذر کتان آسیاب شده از طریق گاواژ به مدت ۱۴ روز

۴. گروه تجربی۲: دریافت‌کننده ۱۶/۶۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش از بذر کتان آسیاب شده از طریق گاواژ به مدت ۱۴ روز

۵. گروه تجربی۳: دریافت‌کننده ۳۳/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش از بذر کتان آسیاب شده از طریق گاواژ

بذر کتان تازه و مرغوب از عطاری تهیه گردید. مقدار مورد نظر از بذر کتان آسیاب شده توسط ترازوی دیجیتال با دقت اندازه‌گیری شده و درون لوله‌های آزمایش به همراه آب مقطر توسط دستگاه روتاری (ورتکس) مخلوط شدند. بعد از ۱۴ روز گاواژ در روز پانزدهم موش‌ها توسط اتر بیهوش شدند. پس از ثابت نمودن موش در ظرف تشریح توسط سوزن، سطح شکم موش بوسیله الکل ضدعفونی گردید. تخمدان‌ها خارج شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تخمدان‌ها توسط ترازوی دیجیتال و قطر آنها توسط کولیس، به ظرف حاوی محلول فرمالین منتقل شدند. پس از گذشت ۸ ساعت، تخمدان‌ها را از فرمالین خارج کرده و در الکل ۷۰ درصد نگهداری شدند. سپس برش‌های بافتی به ضخامت ۶ میکرومتر تهیه شد. نمونه‌ها توسط هماتوکسیلین ائوزین رنگ‌آمیزی شد. فاکتورهای مختلف نظیر درصد افزایش وزن جانور، وزن تخمدان، قطر تخمدان، تعداد فولیکول‌های بدوی، تعداد فولیکول‌های اولیه، تعداد فولیکول‌های ثانویه،

تعداد فولیکول‌های گرااف، تعداد فولیکول‌های آتروفیه شده، تعداد جسم زرد، قطر فولیکول‌های بدوی، قطر فولیکول-های اولیه، قطر فولیکول‌های ثانویه، قطر فولیکول‌های گرااف، قطر فولیکول‌های آتروفیه شده، قطر جسم زرد، در شرایط in vivo و درصد فولیکول‌های آتروفیه شده در شرایط in vitro در گروه‌ها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 17 در $P<0.001$، $P<0.01$ و $P<0.05$ با در نظر گرفتن انحراف معیار (SEM) با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و تست توکی انجام گردید و سپس با استفاده از نرم‌افزار اکسل هیستوگرام‌ها ترسیم شدند.

مراحل In vitro: محیط کشت مصرفی، DMEM بوده که به آن سرم FBS ۲۰ درصد اضافه گردید و توسط فیلتر سر سرنگی استریل شد. pH محیط کشت نیز در حد ۷/۴ تنظیم شد. کلیه محلول‌ها و وسایل از قبل استریل شد. سطح شکمی موش را باز کرده و دستگاه تناسلی را خارج و به پتری استریل حاوی HBSS فیلتر شده منتقل و درب آن را بسته و به زیر هود لامینار واقع در اتاق کشت برده و در زیر هود تخمدان‌ها جداشدند. کشت اندام به روش grid صورت می‌گیرد. در این روش در هر ظرف پتری کشت، یک گرید با سطح مقطع ۱۵×۱۵ میلی‌متر قرار می‌گیرد که گوشه‌های آن خم شده به طوری که پس از قرار گرفتن در ظرف، ارتفاعی حدود ۴ میلی‌متر داشته باشد. سپس کاغذهای فیلتری با منافذ ۰/۲۲ میکرومتر بر روی این پایه‌ها قرار داده می‌شود به طوری که روی گریدها را بپوشاند ولی از آن‌ها بیرون نزند. سپس در داخل پتری، محیط کشت DMEM حاوی ۲۰ درصد سرم FBS ریخته می‌شود تا جایی که کاغذ را خیس کند اما از آن بالاتر نزند. تخمدان را بر روی کاغذ فیلتر قرار داده و در دمای ۳۷ درجه، CO_2 ۵٪، ۹۵٪ هوا و ۹۸-۹۵٪ رطوبت، به مدت یک روز انکوبه می‌شوند. تخمدان گروه کنترل، انکوبه نمی‌شوند و مانند گروه کنترل in vivo هستند.تخمدان گروه شم به روش توضیح داده شده کشت داده می‌شوند. برای گروه تجربی، با توجه به دوز ۳۳/۳ و وزن تخمدان، بذر کتان را وزن کرده و به محیط کشت این تخمدان‌ها افزوده و در شرایط ذکر شده کشت داده می‌شوند. بقیه مراحل و بررسی نتایج بدست آمده مشابه in vivo می‌باشد.

نتایج

از مقاطع نمونه‌های تخمدان گروه‌های تجربی و کنترل و شاهد، فتومیکروگراف تهیه شده که تعدادی از آنها در ادامه خواهد آمد. فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه کنترل (شکل ۱) نشان داده شده است. فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه شاهد (شکل ۲) در ادامه آمده است که فولیکول‌های ثانویه با فلش نشان داده شده اند. همان گونه که در تصاویر مشاهده می‌گردد، با افزایش دوز ماده‌ی مصرفی، به هم‌ریختگی در لایه‌ی سلول‌های گرانولوزا (شکل۳ و ۵)، جداشدگی لایه‌ی تاج شعاعی از اووسیت (شکل۴)، به هم‌ریختگی لایه‌ی تک (شکل۵)، افزایش فولیکول‌های آتروفیه شده (شکل ۶ و ۷)، نسبت به گروه کنترل و شاهد دیده می‌شود. تصاویر از مقطع نمونه‌های تخمدان در شرایط Invitro آتروفیه شدن فولیکول‌ها (شکل۹) نسبت به گروه کنترل In vitro را نشان می‌دهد (شکل۸).

مقایسه درصد افزایش وزن جانور: در بررسی‌های آماری، درصد افزایش وزن موش‌ها از طریق فرمول $\frac{W2-W1}{W1} \times 100$ محاسبه شده است، که در آن W_1 وزن اولیه جانور در شروع آزمایش و W_2 وزن جانور در زمان پایان آزمایش می‌باشد. نتایج آماری بیانگر کاهش وزن

موش‌ها در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ نسبت به گروه‌های شاهد و کنترل است، که این کاهش در گروه تجربی ۲ در سطح ($P<0.05$) و گروه تجربی ۳ ($P<0.001$) می‌باشد (نمودار ۱).

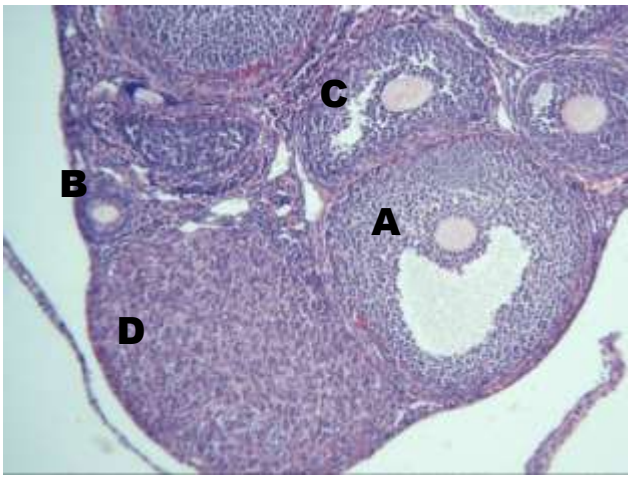
مقایسه میانگین وزن تخمدان‌ها: وزن تخمدان‌ها در گروه-های تجربی، اندازه‌گیری و با گروه‌های کنترل و شاهد مقایسه شده است. نتایج تغییرات معنی‌دار نمی باشد (نمودار ۲).

مقایسه میانگین قطر تخمدان: در بررسی‌های قطر تخمدان تغییر معنی‌داری بین گروه‌های تجربی با شاهد و کنترل، مشاهده نشده است (نمودار۳).

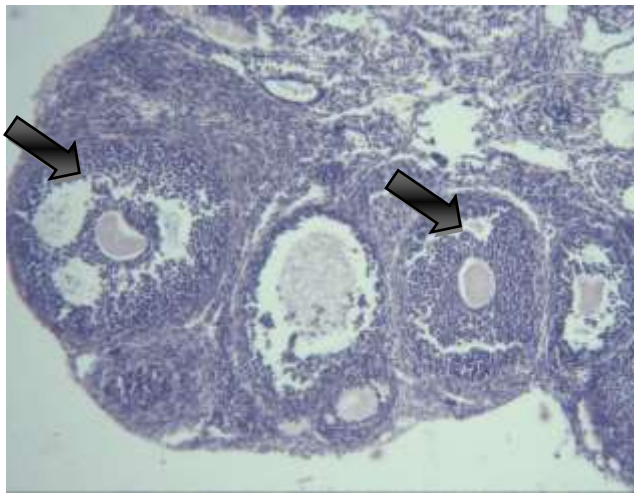
نتایج حاصل از تجربه‌ها بر تعداد فولیکول‌های تخمدانی: نتایج حاصل از تجربه‌ها بر تعداد فولیکول‌های بدوی نشان می‌دهد درگروه تجربی ۲ و۳ در سطح معنی‌داری $P<0.05$ نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌دار مشاهده می‌شود (نمودار ۴). نتایج حاصل از تجربه‌ها بر تعداد فولیکول‌های اولیه حاکی از افزایش معنی‌دار این تعداد در گروه‌های تجربی۱، ۲ و ۳ به ترتیب در $P<0.01$، $P<0.01$ و $P<0.001$ می‌باشد (نمودار ۴). نتایج حاصل از شمارش تعداد فولیکول‌های ثانویه نشان‌دهنده‌ی کاهش فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های تجربی بوده که این کاهش در گروه تجربی۱ در $P<0.05$ معنی‌دار بوده است (نمودار۴). نتایج حاصل از شمارش فولیکول‌های گرااف، در نمودار ۵ نشان-دهنده کاهش تعداد این فولیکول‌ها در گروه‌های تجربی می-باشد. این کاهش در گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ در سطح $P<0.001$ معنی‌دار می‌باشد (نمودار۵). در نتایج حاصل بر تعداد فولیکول‌های آتروفیه شده، افزایش قابل توجه فولیکول‌های آتروفیه شده در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ به ترتیب با حد معنی‌داری $P<0.05$، $P<0.001$ دیده می‌شود (نمودار۵). نتایج حاصل از شمارش جسم‌های زرد در گروه-های تجربی و شاهد و کنترل افزایش معنی‌داری را در گروه-های تجربی۳ با حد معنی‌داری $P<0.05$ نشان می‌دهد (نمودار۵).

نتایج حاصل از تجربی‌ها بر قطر فولیکول‌های تخمدانی: نتایج حاصل از تجربه‌ها بر قطر فولیکول‌های بدوی نشان می‌دهد در گروه تجربی ۲ کاهش با سطح معنی‌داری $P<0.01$ می‌باشد (نمودار۶). نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر فولیکول‌های اولیه، کاهش در گروه تجربی ۲ درسطح معنی داری $P<0.05$ را نسبت به گروه‌های شاهد و کنترل نشان می‌دهد (نمودار ۶). نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر فولیکول‌های ثانویه، تغییر معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد و کنترل نشان نمی‌دهد (نمودار ۷). میانگین قطر فولیکول‌های گراف در گروه‌های تجربی و شاهد در نمودار ۷ نشان داده شده و کاهش معنی‌داری در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ در سطح معنی‌داری $P<0.01$ مشاهده می‌شود (نمودار ۷). قطر فولیکول‌های آتروفیه شده در گروه‌های تجربی اندازه‌گیری شده و با گروه‌های کنترل و شاهد، اختلاف معنی‌داری ندارد (نمودار ۷). قطر جسم زرد در گروه‌های کنترل، شم و تجربی اندازه‌گیری شده و هرسه گروه تجربی ۱، ۲ و ۳ نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری را در سطح $P<0.001$ نشان می‌دهد (نمودار ۷).

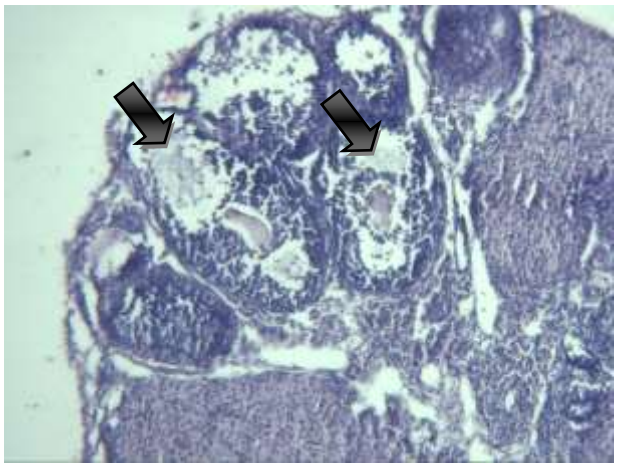
نتایج حاصل از تجربیات کشت تخمدان در شرایط in vitro: درصد آترزی در نتایج حاصل از کشت از طریق فرمول $\frac{\text{تعداد های فولیکول آترتیک}}{\text{تعداد کل فولیکول ها}} \times 100$ محاسبه و در نمودار ۸ نشان داده شده است. این میزان در گروه تجربی (دوز ۳۳/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) که بذر کتان را دریافت کرده بود نسبت به گروه شاهد که در محیط بدون بذر کتان کشت داده شده بود، نشان داده و هر دو گروه تجربی و شاهد، با گروه کنترل in vivo مقایسه شد. افزایش فولیکول‌های آتروفیه شده درگروه تجربی با حد معنی‌داری $P<0.001$ مشاهده شد (نمودار ۸).



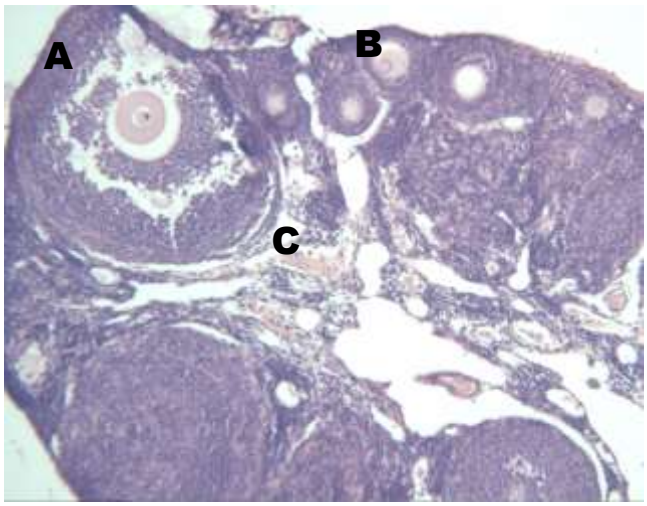
شکل ۱ـ فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه کنترل. A: فولیکول گرااف B: فولیکول اولیه C: فولیکول ثانویه D: جسم زرد (×۱۰۰)



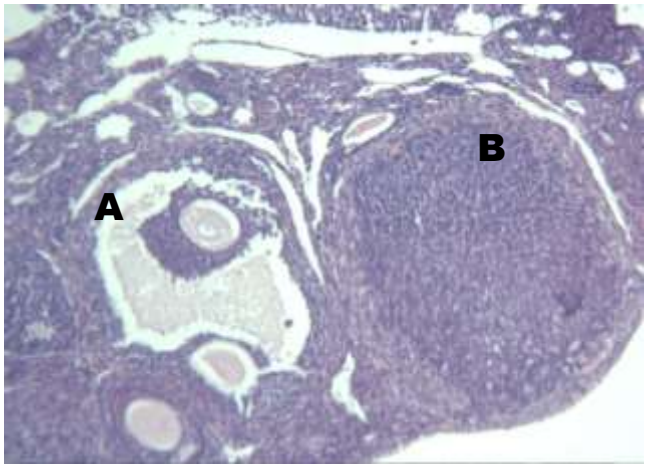
شکل۲ـ فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه شاهد. فلش‌ها نشان‌دهنده فولیکول‌های ثانویه (×۱۰۰)



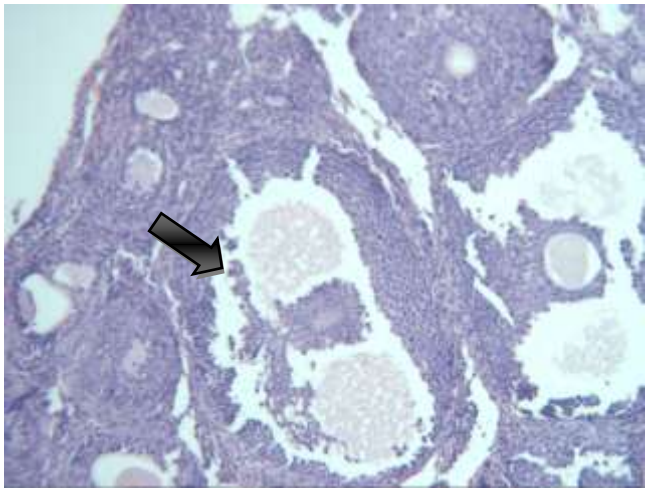
شکل ۳ـ فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه تجربی ۱ (دوز ۳/۳۳ mg/kg). به هم ریختگی در سلول‌های گرانولوزا در فولیکول‌های آتروفیه شده با فلش نشان داده شده (×۱۰۰).



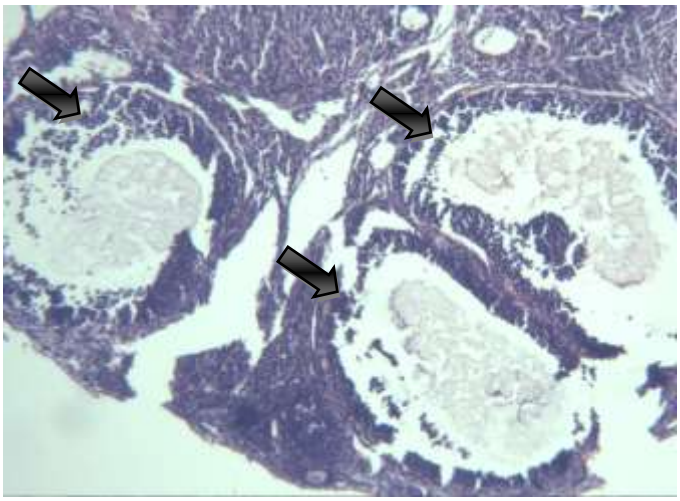
شکل ۴ـ فتو میکروگراف مقطع تخمدان در گروه تجربی ۲. A : جداشدگی تاج شعاعی از ائوسیت در فولیکول آتروفیه شده B : فولیکول‌های اولیه C: رگ خونی (۱۰۰×).



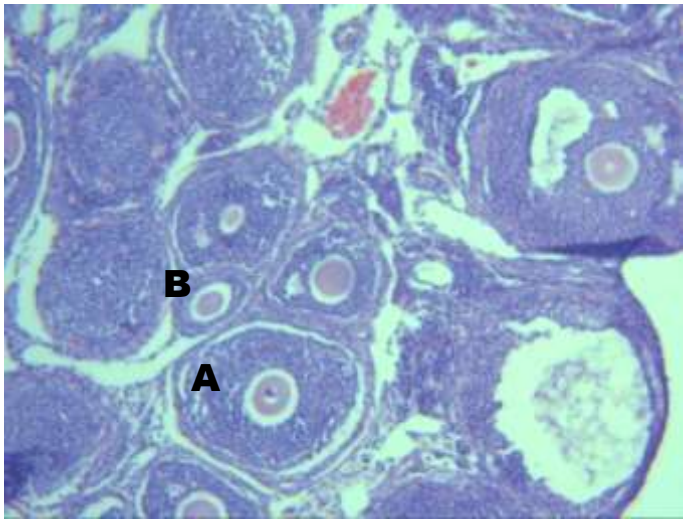
شکل ۵ـ فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه تجربی ۲. A: به هم ریختگی لایه گرانولوزا وبه هم ریختگی لایه تک در فولیکول گرااف،B: جسم زرد (۱۰۰×).



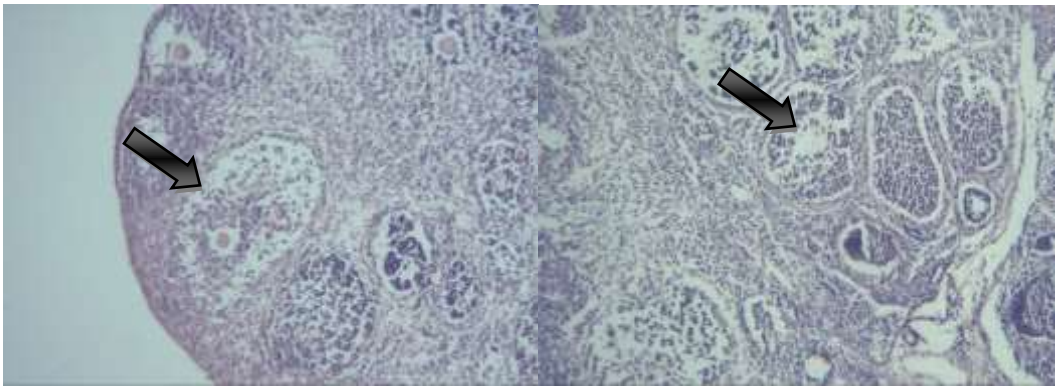
شکل۶ـ فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه تجربی ۳. فولیکول‌های آتروفیه شده نشان داده شده است (۱۰۰×).



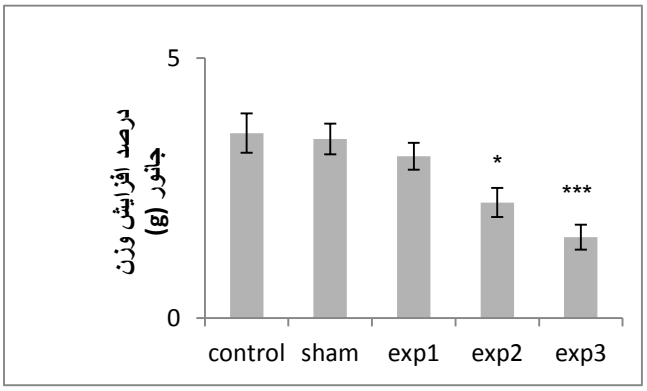
شکل۷) فتومیکروگراف مقطع تخمدان در گروه تجربی ۳ (دوز ۳۳/۳) فولیکول‌های آتروفیه شده نشان داده شده (۱۰۰×).



شکل ۸) فتومیکروگراف تخمدان در شرایط In vitro؛ گروه کنترل. A: فولیکول در حال رشد. B: فولیکول اولیه (۱۰۰×).

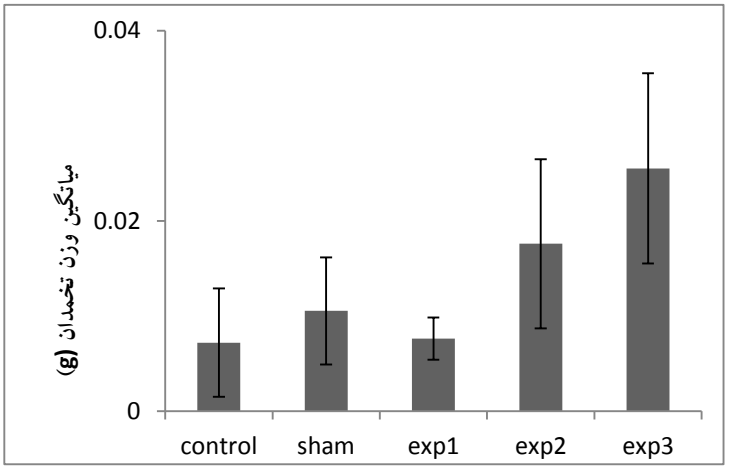


شکل ۹) فتومیکروگراف تخمدان در شرایط Invitro؛ گروه تجربی(دوز ۳۳/۳)، فولیکول‌های آتروفیه شده مشاهده می‌شود (۱۰۰×).

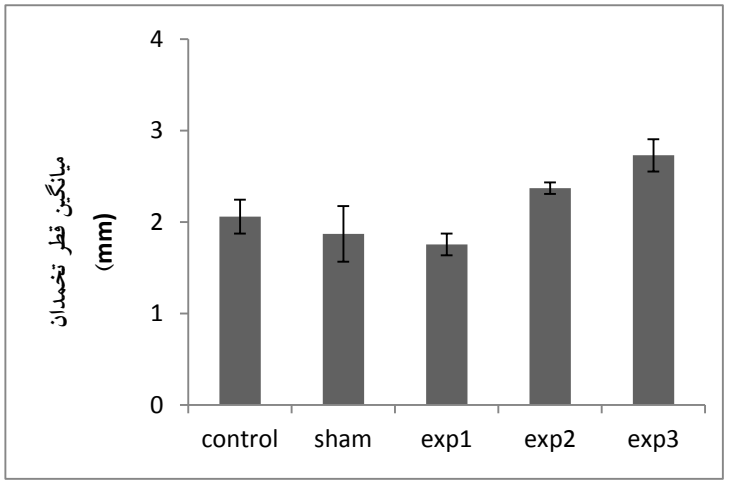


نمودار ۱ـ مقایسه درصد افزایش وزن جانور در گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی ۱و۲و۳ (P<0.001)***(P<0.01)** (P<0.05)*

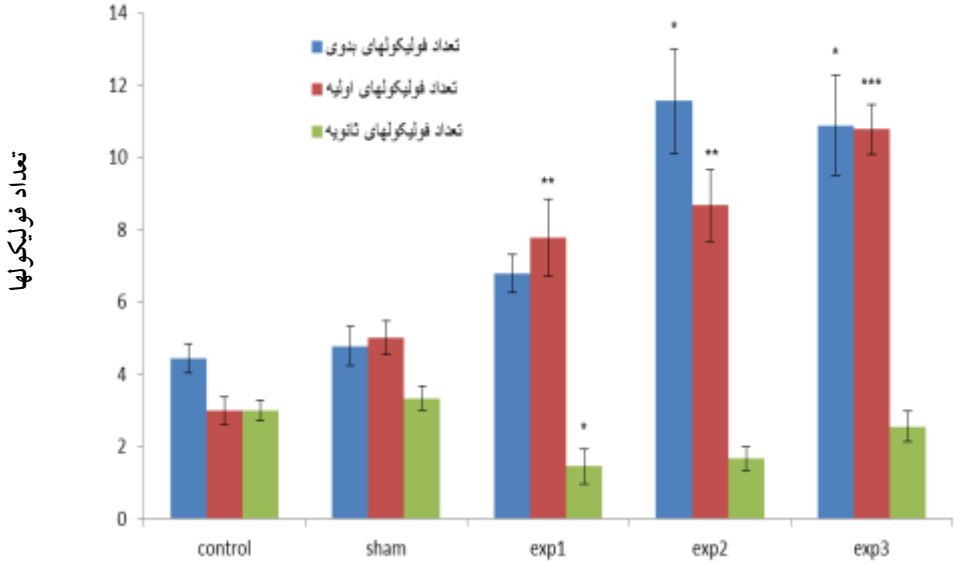
Control :گروه کنترل؛ Sham: گروه دریافت کننده حلال؛ exp 1 (گروه تجربی ۱): تیمار با دوز تجربی ۳,۳۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ exp 2 (گروه تجربی ۲): تیمار با دوز تجربی ۱۶,۶۶ mg/kg؛ exp 3 (گروه تجربی ۳): تیمار با دوز تجربی ۳۳,۳ mg/kg



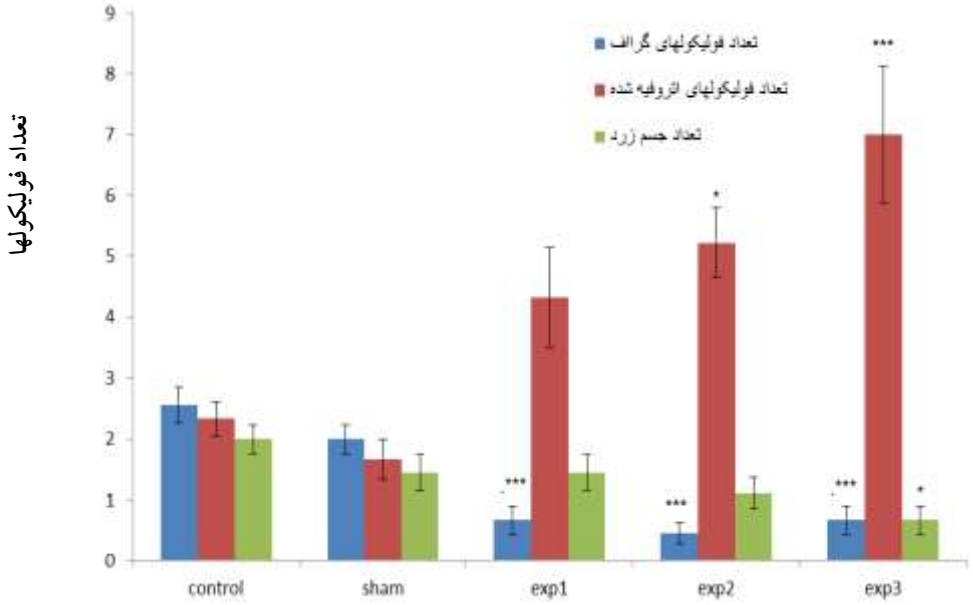
نمودار ۲ـ مقایسه میانگین وزن تخمدان ها در گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی ۱، ۲ و ۳. (P<0.001)***(P<0.01)** (P<0.05)*



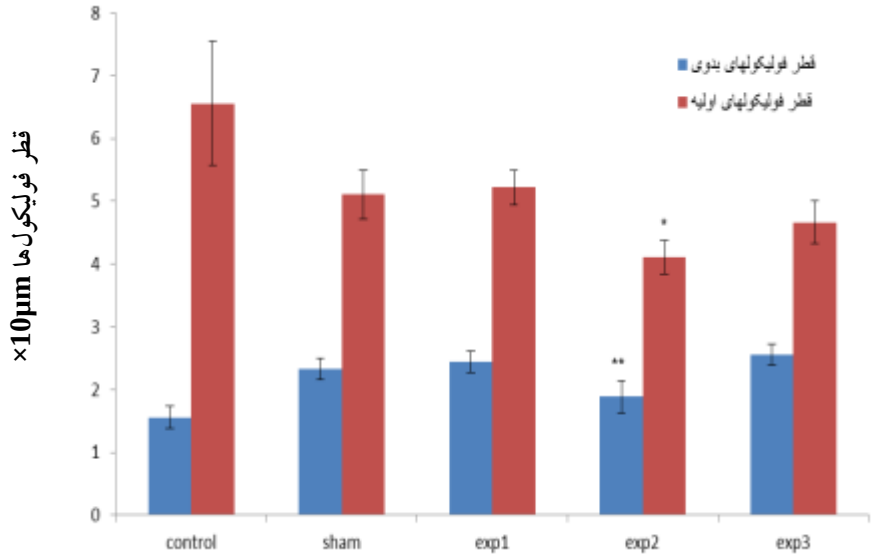
نمودار ۳ـ مقایسه میانگین قطر تخمدان در گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی ۱، ۲ و ۳. (P<0.001)***(P<0.01)** (P<0.05)*



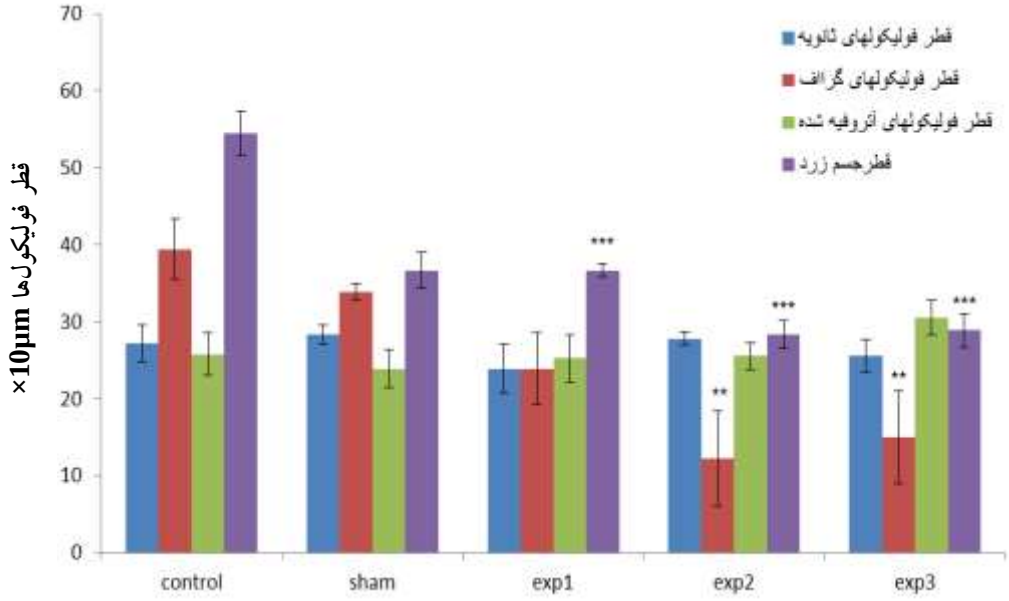
نمودار ۴ـ مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های بدوی، تعداد فولیکول‌های اولیه و تعداد فولیکول‌های ثانویه در گروه‌های کنترل،شاهد، تجربی ۱، ۲ و ۳. (*(P<0.05) **(P<0.01)***(P<0.001



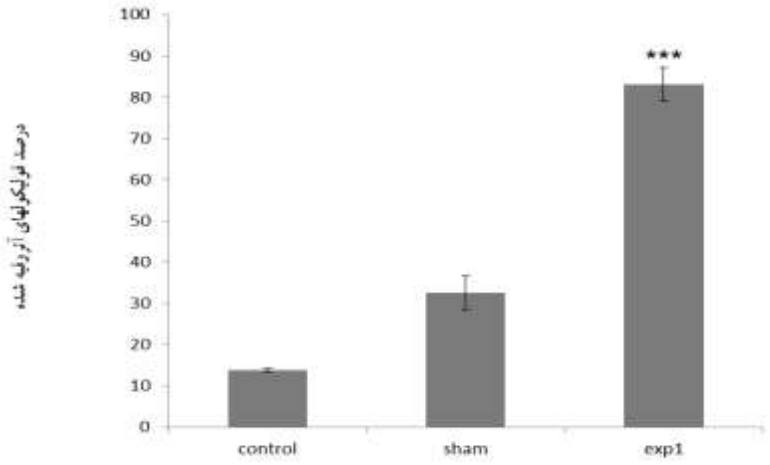
نمودار ۵ـ مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های گراف، تعداد فولیکول‌های آتروفیه شده و تعداد جسم زرد در گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی ۱، ۲ و ۳. (*(P<0.05), **(P<0.01),***(P<0.001



نمودار ۶ـ مقایسه میانگین قطر فولیکول‌های بدوی و قطر فولیکول‌های اولیه در گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی ۱، ۲ و ۳.
*(P<0.05), **(P<0.01), ***(P<0.001)



نمودار ۷ـ مقایسه میانگین قطر فولیکول‌های ثانویه، قطر فولیکول‌های گرااف، قطر فولیکول‌های آتروفیه شده و قطر جسم زرد در گروه‌های کنترل، شاهد، تجربی ۱، ۲ و ۳. *(P<0.05), **(P<0.01), ***(P<0.001)



نمودار ۸ـ مقایسه‌ی میانگین درصد فولیکول‌های آتروفیه شده در گروه‌های تجربی و شاهد (شم) با گروه کنترل.
*(P<0.05), **(P<0.01), ***(P<0.001)

بحث

مطالعات مختلف نشان داده است که خانم‌ها تمایل زیادی به استفاده از گیاهان دارویی دارند و معمولاً به طور مکرر برای درمان مشکلاتی همچون دیسمنوره، رفع علائم منوپوز، اختلالات قاعدگی، پیشگیری از پوکی استخوان و همچنین مشکلات دوران بارداری مثل مشکلات گوارشی، خواب و استرس از داروهای گیاهی استفاده می‌کنند. اغلب زنان باردار نیز با این تصور که درمان‌های طبیعی اختلال آفرین نیستند و عوارضی برای مادر و جنین در برندارند، اقدام به خوددرمانی با ترکیبات گیاهی می‌کنند [۹]. بررسی‌ها روی تأثیر بعضی گیاهان حاوی فیتواستروژن مثل سویا، شبدر قرمز و کوهاش سیاه بر یائسگی انجام شده است و در همه آنها ثابت شده که از آنجایی که این گیاهان دارای فیتو استروژن هستند، سبب افزایش استروژن و کاهش گرگرفتگی می‌شود [۱]. در تحقیقات بر عصاره گیاه پنج انگشت مشاهده شده که این گیاه دارای فعالیت استروژنی و پروژسترونی می‌باشد نتایج نشان می‌دهد این گیاه باعث مهار آزاد سازی پرولاکتین شده و همچنین مرحله لوتئال چرخه قاعدگی را طولانی می‌کند [۱۵]. به نظر می‌رسد تجویز استروژن‌ها به دلیل وجود مکانیسم فیدبکی بتوانند باعث بروز اختلالات گوناگونی در روند رشد و نمو فولیکول‌های تخمدانی و بافت تخمدان گردد [۲۶]. در برخی مطالعات انجام شده نشان می‌دهد در مواردی که از مقادیر بیش از حد مجاز فیتواستروژن‌ها استفاده گردد، تأثیرات نامطلوبی بر بسیاری از سیستم‌های بدنی از جمله دستگاه تولیدمثلی قابل مشاهده می‌باشد و حیوانات ماده پس از رشد تخمک‌گذاری نمی‌کردند [۱۳]. در آزمایشی روی دانه سویا تخریب فولیکول‌های تخمدانی مشاهده می‌شود [۸، ۱۳]. استفاده از ۱۰ درصد از کتان در رژیم غذایی موش کاهش وزن هنگام تولد در نوزادان موش، اندازه رحم بزرگ‌تر و تخمدان با وزن نسبی بیشتر و طولانی شدن فازهای مختلف سیکل استروس مشاهده شد [۱۴]. در آزمایش دیگر، رژیم غذایی ۱۰ درصد برخی از هورمون‌ها را تولید می‌کند که سطح استرادیول سرم را افزایش می‌دهد، چرخه فحلی طولانی‌تر و رحم بزرگتر و افزایش وزن تخمدان در فرزندان ماده

مشاهده می‌شود [۲۴]. در تحقیق حاضر نیز کاهش وزن و افزایش نسبی در وزن تخمدان و در موش‌های گروه تجربی مشاهده کردیم. در اثرات باروری *Turraeanthus africanns* مشاهده کردند که در گروه‌هایی از موش که از این گیاه استفاده کرده‌اند افزایش در وزن تخمدان وجود دارد [۱۰]. این گیاه دارای فیتواستروژن می‌باشد [۱۴، ۲۵]. در آزمایشات ما روی بذر کتان نیز باتوجه به این که بذر کتان نیز دارای فیتواستروژن است افزایش وزن تخمدان در گروه-های تجربی مشاهده کردیم. در یکی دیگر از مطالعات، تغذیه با دانه کتان یا پودر کتان در دوران بارداری، شیردهی و بعد از شیردهی با اثر بر وزن نسبی تیموس و کبد و نامنظمی چرخه فحلی همراه بود. به طور کلی این مشاهدات نشان می‌دهد که نیاز به احتیاط است زیرا که مصرف دانه کتان، پودر تخم کتان یا SDG در بخشی از یک رژیم غذایی در مراحل بحرانی تولیدمثل می‌تواند اثر گذار باشد [۲۰].

در تحقیق حاضر نیز با توجه به مشاهده میزان بالای آتروفیه شدن در فولیکول‌ها در مراحل بارداری اثرات منفی روی حاملگی و جنین را می‌توان مشاهده کرد. سولومون و همکاران طی بررسی‌هایی که روی عصاره ریشه گیاه *Rumex steudelii* انجام دادند، کاهش تعداد فولیکول-های گرااف، افزایش فولیکول‌های آترتیک در دوز ۳ میلی-گرم بر کیلوگرم مشاهده کردند [۲۱]. ریشه این گیاه به عنوان یک عامل سقط جنین و نیز در کنترل باروری به شکل سنتی استفاده می‌شود. همچنین این گیاه دارای فیتواستروژن نیز می‌باشد [۱۲]. در بررسی انجام شده روی شمارش تعداد فولیکول‌ها اختلال آنها را در هنگامی که در معرض این گیاه قرار گیرند نشان می‌دهد [۴]. عصاره متانولی این گیاه می-تواند باعث تغییرات در رحم و تخریب فولیکول‌های تخمدان به وسیله مهار رشد فولیکول‌های اولیه می‌شود. تغییرات بافتی و ریختی نیز روی سیستم تولیدمثلی ماده مشاهده می‌شود [۲۱]. از آنجایی که بذر کتان نیز حاوی فیتواستروژن است می‌تواند تغییراتی مشابه گیاه *Rumex steudelii* ایجاد کند. در تحقیق حاضر نیز کاهش معنی‌دار در تعداد فولیکول‌های گرااف و افزایش معنی‌دار تعداد فولیکول‌های آتروفیه شده و افزایش معنی‌دار در فولیکول-های اولیه را در دوزهای تجربی مشاهده کردیم. رامش و همکاران در بررسی‌ها روی عصاره الکلی گیاه *Portulaca oleraca* با توجه به تخمک‌گذاری و فازهای مختلف استروس در موش ماده فعالیت ضدباروری مشاهده کردند [۱۷]. این مطالعه نشان داد که با مصرف این گیاه چرخه دیااستروس طولانی‌تر می‌شود. همچنین وزن تخمدان و رحم افزایش می‌یابد و اثر ضدتخمک‌گذاری دارد که به علت وجود فلاونوئید در این گیاه است [۱۷]. در تحقیق ما نیز بذر کتان از آنجایی که دارای ماده مشترک فلاونوئید با گیاه *P. oleracea* است نتایج مشابهی در افزایش وزن تخمدان وجود داشت. فیپس و همکاران در در بررسی اثرات دانه کتان به این نتیجه رسیدند که مصرف آن سبب طولانی شدن فاز لوتئال چرخه قاعدگی در انسان می‌شود [۱۷]. گزارش شده که فیتواستروژن می‌تواند به فرزندان بعد از تولد از طریق شیر مادر انتقال داده شده و بر تولیدمثل فرزندان در نوجوانی و زندگی آینده تأثیر بگذارد. اختلالات باروری عبارتند از: بلوغ تغییر یافته، اختلال در سیکل‌های استروس و کاهش باروری در فرزندان ماده و کاهش رفتار جنسی در فرزندان نر [۲۵]. تو و همکاران در سال ۱۹۹۹ رت ماده را از بدو تولد در معرض ۱۰ درصد بذر کتان در رژیم غذایی قرار دادند. مشاهده کردند باعث شروع زودتر بلوغ جنسی، افزایش وزن نسبی تخمدان، افزایش سطح استرادیول سرم و طولانی شدن چرخه استروس می‌شود [۲۴]. نتایج ما هم افزایش وزن نسبی تخمدان در گروه‌های تجربی ۲ و ۳ را نشان داد که این افزایش معنی‌دار نبود. تو و همکاران در سال ۱۹۹۸ تغذیه رژیم غذایی در سطح ۵

درصد یا ۱۰ درصد بذر کتان در در دوران بارداری و شیردهی انجام دادند. مشاهده کردند بذر کتان اثری بر پیامد بارداری نداشت به جز اینکه در رژیم غذایی ۱۰ درصد بذر کتان کاهش وزن هنگام تولد مشاهده شد. در فرزندان ماده وزن نسبی رحم و تخمدان افزایش یافته، سریع تر به سن بلوغ رسیده، وزن بدن کاهش یافته، طول چرخه استروس افزایش یافته است. در حالی که در جنس نر کاهش در وزن در بدو تولد، بزرگ شدن غدد جنسی و افزایش وزن نسبی پروستات نشان‌دهنده اثرات استروژنی بوده است [۱۴].

در تحقیق حاضر، کاهش وزن بدن، افزایش وزن تخمدان، کاهش تعداد فولیکول‌های گراف و در حال رشد، به هم-ریختگی در لایه‌ی سلول‌های گرانولوزا، جداشدگی لایه‌ی تاج شعاعی از اووسیت، به هم ریختگی لایه‌ی تک، افزایش فولیکول‌های آتروفیه‌شده و به هم‌ریختگی استرومای تخمدان دیده می‌شود که نشان می‌دهد بذر کتان در فرایند ائوژنز اختلال ایجاد می‌کند و می‌تواند اثرات ضدباروری داشته باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین دیگر محققان پیشنهاد می‌کنند که اگرچه بذر کتان دارای اثرات مفید می‌باشد اما مصرف آن باید با احتیاط بیشتری صورت گیرد. هم‌چنین آگاهی از اثرات این ماده باعث می‌شود زنان باردار از مصرف بیش از حد آن در اوایل بارداری، خودداری کنند. البته مکانیسم و نحوه‌ی اثر این ماده، و میزان دوز مصرفی ایمن برای انسان، باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد.

منابع

۱- حکیمی، س.، علیزاده، س.، دل آذر، ع.، عباسعلیزاده، ف.، مقدم، ر. ۱۳۸۵. بررسی اثر احتمالی دانه شنبلیله بر گرگرفتگی زنان یائسه. فصلنامه گیاهان دارویی، سال پنجم جلد سوم. شماره نوزدهم، صفحات ۹-۱۴.

۲- زرگری، ع. ۱۳۶۸. گیاهان دارویی. جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحات ۴۰۸-۴۱۵.

۳- شریف‌نیا ف.، اسدی م. ۱۳۷۹. فلور ایران شماره ۳۴، تیره کتان، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران، صفحه ۴۲.

4- Bolon B., Bucci T.J., Warbritton A.R., Chen J.J., Mattison D.R., Heindel J.J. (1997), Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: Results from continuous breeding bioassays. *Fundamental Applied Toxicology*, 39: 1-10.

5- Cederroth C.R., Zimmermann C., Beny J.L., Schaad O., Combepine C., Descombes P., Doerge D.R., Pralong F.P., Vassalli J.D., Nef S. (2010), Potential detrimental effects of a phytoestrogen-rich diet on male fertility in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 321: 152-160.

6- Cardozo J.R., Báo S.N. (2007), Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. Animal Reproductive Science, 97: 237-245.

7- Collins T.F.X., Sprando R.L., Black T.N., Olejnik N., Wiesenfeld P.W., Babu U.S., Bryant M., Flynn T.J., Ruggles D.I. (2003), Effects of flaxseed and defatted meal on reproduction and development in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 819-834.

8- Cannon J.D., Cherian Shaw M., Lovekamp Swan T. (2007), Granulosa cell

expression of G1/S phase cyclins and cyclindependent kinases in PMSG induced follicle growth. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264: 615-710.

9- Carlson E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebak N.E. (1992), Evidence for decreasing quality of semen during the past 50 years. *British Medical Journal*, 305: 609-613.

10- Dieudonné Massoma L., Manuel G., Gustavo F. (2012), Fertility and estrogenic activity of Turraeanthus africanus in combination with Lepidium meyenii (Black maca) in female mice. *European Journal of Integrative Medicine*, 4: 345-351.

11- Fukumitsu S., Aida K., Shimizu H., Toyoda K. (2010), Flaxseed lignan lowers blood cholesterol and decreases liver disease risk factors in moderately hypercholesterolemic men. Nutrition Research, 30(7): 441-446.

12- Gebrie E., Makonnen E., Debella A., Zerihun L. (2005), Phytochemical screening and pharmacological evaluations for the antifertility effect of the methanolic root extract of the methanolic root extract of *Rumex steudelii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 96: 139-143.

13- Hirshfield A.N. (1991), Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review Cytology*,124: 43-101

14- Jonathans S., Dehadral S., Prakash A.D. (1995), Estrogenic activity in Ethanolic extract of *Bupleram marginatum*. *Journal of Pharmacology*, 27: 256-261.

15- Jelodar J.A., Karami E. (2013), Effect of hydroalkoholic extract of vitex agnus-Castus fruit on ovarian histology in rat with induced polycystic ovary syndrome (PCOSS). *Journal of Babol University of Medical Science*, 13(3): 96-102.

16- Phipps W.R., Martini M.C., Lampe J.W., et al. (1993), Effect of flax seed ingestion on the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology*, 77: 1215-1219.

17- Ramesh L., Hanumanatappa B. (2013), Effect of ethanol extract of Portulacaoleracea L on ovulation. *Journal of Pharmacy Reserch*, 78: 431-436.

18- Rogers J.M., Kavlock R.J. (2001), Developmental toxicology. In:Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology-The Basic Science of Poisons, sixth ed. McGraw Hill, New York, 42: 351-386.

19- Sprando R.L., Collins T.F.X., Black T.N. (2000), The effect of maternal exposure to flaxseed on spermatogenesis in F1 Generationrat. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 325-334.

20- Solomon T., Largesse Z., Mekbeb A., Eyasu M., Asfaw D. (2010), Effect of Rumex steudelii methanolic root extract on ovarian folliculogenesis and uterine histology in female albino rats. *African Health Sciences*, 10(4): 353-361

21- Thompson L.U., Robb P., Serraino M., Cheung F. (1991), Mammalian lignin production from various foods. *Nutrition and Cancer*, 16:43-52.

22- Toppari J., Larsen J., Christiansen P., Giwercman A.,Grandjean P., Guillette L. J., Jegou B., Jensen T. K.,Jouannet P., Keiding N., Le€ers H., McLachla J. A.,Meyer O., Juller J., Pajpert-DeMeyts E., Scheike T.,Sharpe R., Sumpter J. and Skakkebaek N.(1996), Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*, 104: 741-776.

23- Tou J.C.L., Chen J., Thompson, L.U., (1998), Flaxseed and its lignin precursor, secoisol ariciresinol diglycoside, affect

Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues, 56: 555-570.

25- Whitten P.L., Lewis C., Nafitolin F. (1993), A phytosterogen diet induces the premature an ovulatory syndrome in lactationally exposed female rats. *Biological Reproduction*, 49: 1117-1121.

pregnancy outcome and reproductive development in rats. *Journal of Nutrition*, 128: 1861-1868.

24- Tou J.C.L., Chen J., Thompson L.U., (1999), Dose, timing, and duration of flaxseed exposure affect reproductive indices and sex hormone levels in rats. Journal of