Veterinary Clinical Pathology, Vol.15, No. 60, Winter 2022

"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1942161.1331**

Evaluation of the effect of *Aloe vera* gel on ovarian tissue structure in Nicotine-receiving Rats

Shahin, A.M.[1], Bahrami, A.M.[2*], Delkhosh, A.[3], Shakarami, N.[4]

1- Graduate of Histology, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran.
2- Department of Histology and Microbiology, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran.
3- Ph.D Student in Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
4- Laboratory Expert, Faculty of Paraveterinary Medicine, Ilam University, Ilam, Iran.
*Corresponding author's email: Am.bahrami@ilam.ac.ir
(Received: 2021/10/20 Accepted: 2022/2/8)

Abstract

Nicotine reduces reproductive activities as well as fertility in both males and females. Its function is by inhibiting the release of progesterone in the luteal phase. *Aloe vera* is one of the medicinal plants with the scientific name(*Aloe barbadensis*) belonging to the Asphodelaceae family, which has maintained its popularity for a long period of time due to its many medicinal properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anti-aging effects. In the present study, the protective effect of *Aloe vera* gel on ovarian histological changes in nicotine-receiving rats was investigated. For this purpose, 32 female Wistar rats were divided into 4 groups consisting of control group (without any treatment), nicotine treatment (6 weeks nicotine at 0.2 mg/kg via intraperitoneal injection), nicotine- *Aloe vera* treatment (6 weeks of nicotine injection similar to the previous group+*Aloe vera* gel at 400 mg/kg orally) and *Aloe vera* treatment group (6 weeks of oral *Aloe vera* gel similar to group 3). At the end of the study period, the mice were euthanized by ketamine-xylazine injection and their ovaries were transferred to the histological laboratory to prepare tissue sections and perform hematoxylin-eosin staining. The results were analyzed by one-way analysis of variance and LSD post hoc tests ($p<0.05$). Followingnicotine treatment, weight loss, decrease in ovarian weight, number of healthy and active follicles, new corpus luteum and increase in the number of atretic follicles were observed. However, consumption of *Aloe vera* gel was able to significantly improve all microscopic complications and disorders and macroscopic changes caused by nicotine injection ($p<0.05$). The results of this study showed that oral administration of *Aloe vera* gel can reduce or inhibit the harmful effects of nicotine on ovarian tissue in rats.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: *Aloe vera*, Nicotine, Ovary, Rat.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1942161.1331

ارزیابی تأثیر ژل گیاه صبر زرد (*Aloe vera*) بر ساختار بافتی تخمدان موش‌های صحرایی دریافت‌کننده نیکوتین

علی‌محمد شاهین[۱]، علی‌محمد بهرامی[۲*]، عارف دلخوش[۳]، نعمت‌الله شاکرمی[٤]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بافت‌شناسی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۲- دانشیار گروه بافت‌شناسی و میکروب‌شناسی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۳- دانشجوی دکترای تخصصی آسیب‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
٤- کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: am.bahrami@ilam.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱٤۰۰/۷/۲۸ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۱۱/۱۹)

چکیده

نیکوتین باعث کاهش فعالیت‌های تولید مثلی و نیز باروری می‌شود که عملکرد آن از طریق مهار آزادسازی پروژسترون در فاز لوتئال صورت می‌گیرد. گیاه صبر زرد یا آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) یکی از گیاهان دارویی با نام علمی (*Aloe barbadensis*) و متعلق به خانواده آسفودلاسه ست که با داشتن خواص دارویی بسیار زیاد نظیر آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و ضد پیری مورد توجه بوده‌است. در مطالعه حاضر اثر محافظتی ژل گیاه مذکور بر تغییرات بافتی تخمدان موش‌های صحرائی دریافت‌کننده نیکوتین مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار به ٤ گروه شاهد (بدون تیمار)، تیمار با نیکوتین (٦ هفته نیکوتین به میزان ۰/۲ mg/kg وزن حیوانات/تزریق داخل صفاقی)، تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا شامل ٦ هفته تیمار (با نیکوتین مشابه گروه ۲ و ژل گیاه آلوئه‌ورا به میزان ٤۰۰ mg/kg وزن حیوانات/خوراکی) و تیمار فقط با ژل گیاه آلوئه‌ورا (٦ هفته مشابه گروه ۳) تقسیم شدند. در پایان دوره مطالعه، موش‌ها با تزریق کتامین-زایلازین آسان‌کشی‌شده و تخمدان آن‌ها جهت تهیه مقاطع بافتی و انجام رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از تیمار با نیکوتین، کاهش وزن بدن، وزن تخمدان، تعداد فولیکول‌های سالم و فعال، جسم زرد جدید و نیز افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک قابل مشاهده بود. همچنین مصرف ژل گیاه آلوئه‌ورا توانست به طور معنی‌داری تمامی عوارض و تغییرات میکروسکوپی و ماکروسکوپی ناشی از تزریق نیکوتین را بهبود بخشد ($p<۰/۰۵$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مصرف خوراکی ژل آلوئه‌ورا می‌تواند موجب کاهش و یا مهار اثرات مضر نیکوتین بر بافت تخمدان موش صحرایی شود.

کلیدواژه‌ها: آلوئه‌ورا، تخمدان، موش صحرائی، نیکوتین.

مقدمه

نیکوتین یک آلکالوئید روغنی سمی است که از گیاه تنباکو استخراج می‌شود. ورود نیکوتین به بدن از راه‌های مختلفی مانند پوست، ریه‌ها، مخاط بینی و دهان و همچنین از طریق دود سیگار انجام می‌شود و پس از جذب شدن در خون، در کل بدن پخش می‌گردد (Katzung *et al*., 2009). دود سیگار حاوی طیف وسیعی از اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد است که قادرند به طور مستقیم یا غیر مستقیم استرس اکسیداتیو را در بدن القاء کنند (Rahmani Kahnmoei, 2016). نیکوتین یکی از ٤٠٠٠ ماده شیمیایی است که در محصولات تنباکو مانند: سیگارت، سیگار، پیپ و قلیان وجود دارد و از نظر ساختمان شیمیایی آلکالوئیدی بدون اکسیژن است که از کربن، هیدروژن و ازت ($C_{10}H_{14}N_2$) تشکیل یافته و نام شیمیایی آن آلفاپیریدیل-بتا-N متیل پیرولیدین است. در گیاه تنباکو، درصد نیکوتین موجود در حدود ۰/۵ تا ۰/۸ درصد می‌باشد و همچنین هر نخ سیگار دارای حدود ٢٤-٢ درصد نیکوتین است که بین ۹۰-۵۰ درصد آن در هنگام سیگار کشیدن جذب بدن می‌شود (Carvalho *et al*., 2006). ثابت شده‌است که نیکوتین توانایی برهم زدن هومئوستاز دستگاه‌های گوناگون بدن از جمله دستگاه گردش خون، غدد درون ریز و همچنین دستگاه تولیدمثلی را دارد (Carvalho *et al*., 2006). علاوه بر این، نیکوتین با ساختار غشاء سلولی نیز واکنش داده و با رهاسازی گونه‌های اکسیژن فعال (reactive oxygen species; ROS) باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در این ساختار می گردد (Arabi, 2004). مطالعات متعددی نشان می‌دهند که نیکوتین حاصله از مصرف سیگار، تاثیر منفی فراوانی بر نرخ باروری دارد (Subramanyan *et al*., 2006). در واقع ماده مذکور با تأثیر بر سلول‌های تک داخلی در تخمدان، اثرات کاهنده شدیدی بر روی تولید آندروژن‌ها در بدن دارد (Saleh *et al*., 2002).

استفاده از گیاهان دارویی رایج در طب سنتی، به منظور جلوگیری از اثرات جانبی داروهای شیمیایی، در درمان بسیاری از بیماری‌ها گسترش یافته است (Ghorbani *et al*., 2020). گیاه دارویی صبر زرد یا آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) یکی از این گونه‌های مهم دارویی است که ترکیبات فعال دارویی و مؤثره آن مانند: امودین، آلوئه، باربالوئین، استرول‌ها و آسمانان، در ژل و پوست برگ‌های آن وجود دارد (Rajasekaran *et al*., 2016).

تخمدان‌ها ارگان‌های مهمی هستند و آسیب و فقدان آن‌ها موجب عوارض خطرناکی مانند استئوپروز می‌گردد (Amo Oghli Tabrizi *et al*., 2007). گزارش شده که تجویز عصاره گیاه آلوئه‌ورا موجب افزایش رشد و تکامل فولیکول‌های تخمدانی و به دنبال آن، افزایش ترشح استروژن از سلول‌های فولیکولی، جلوگیری از آترزی فولیکول‌ها و در نتیجه افزایش کیفیت تخمک درگروه موش‌های تحت استرس و دریافت‌کننده گیاه فوق می‌گردد (Afrogh *et al*., 2016). لذا با توجه به مطالب ذکرشده مبنی بر خواص دارویی مهم گیاه آلوئه‌ورا و نیز اهمیت محافظت از بافت تخمدان، این مطالعه برای بررسی تاثیر حفاظتی گیاه آلوئه‌ورا در بافت تخمدان موش‌های دریافت‌کننده نیکوتین انجام شد، تا شاید بتوان از این گیاه در کاهش ناباروری‌های با منشا آسیب‌های تخمدانی بهره برد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی مداخله‌گر آزمایشگاهی بود که برای انجام آن، تعداد ۳۲ سر موش صحرایی ماده بالغ ۸ هفته‌ای نژاد ویستار با محدوده وزنی ۱۰±۱۸۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام خریداری شد. تمامی موش‌ها در این مطالعه که به مدت ۸ هفته به طول انجامید در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری و با غذای تجاری پلت تغذیه شده و به طور آزاد به آب دسترسی داشتند. پروتکل این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مورد تایید کمیته‌های بین‌المللی حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی طراحی شد. به منظور سازش با شرایط محیطی، حیوانات به مدت ۱ هفته نگهداری و سپس به صورت تصادفی ساده به ٤ گروه ۸ تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

۱) گروه شاهد: موش‌های این گروه بدون هرگونه تیماری در مطالعه شرکت داده‌شدند.

۲) گروه تیمار با نیکوتین: حیوانات این گروه به مدت ٦ هفته نیکوتین (سیگما، آمریکا) را به میزان ۰/۲ mg/kg وزن بدن به روش داخل صفاقی دریافت کردند.

۳) گروه تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا: به حیوانات این گروه به مدت ٦ هفته علاوه بر تزریق داخل صفاقی نیکوتین به همان میزان استفاده شده برای موش‌های گروه ۲، همزمان ژل گیاه آلوئه‌ورا هم به میزان mg/kg ٤۰۰ وزن بدنشان را به صورت خوراکی (گاواژ) دریافت کردند.

٤) گروه تیمار با آلوئه‌ورا: به موش‌های این گروه به مدت ٦ هفته فقط ژل گیاه آلوئه‌ورا به میزان mg/kg ٤۰۰ وزن بدن گاواژ شد.

لازم به ذکر است که بر اساس مطالعات قبلی، دوزهای استفاده شده برای نیکوتین و نیز ژل گیاه آلوئه‌ورا، انتخاب شدند (Balazadeh Kocheh and Hassanzadeh, 2014; Bahrami Tapehbor *et al*., 2016; Sistani *et al*., 2017).

پس از پایان هفته ششم آزمایش، موش‌های مورد مطالعه با تزریق داخل صفاقی کتامین (روتکس مدیا، آلمان) به میزان mg/kg ۱۰۰ و زایلازین (کلا، بلژیک) به میزان mg/kg ۱۰ آسان‌کشی شدند. سپس با ایجاد یک برش در ناحیه خلفی محوطه بطنی موش‌ها، تخمدان راست آن‌ها خارج گردید. بعد از جداسازی چربی‌ها و نسوج اضافی اطراف تخمدان‌ها، وزن آن‌ها با ترازوی دیجیتالی (AND مدل Fx3001، ژاپن) با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری و یادداشت و سریعا جهت جلوگیری از اتولیز، به داخل ظروف حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد (قطران شیمی تجهیز- ایران) منتقل گردید. سپس نمونه‌ها توسط پارافین (قطران شیمی تجهیز، ایران) قالب‌گیری شده و با استفاده از میکروتوم دورانی (پاوندآب، ایران)، از آن‌ها برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و با استفاده از روش هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) (مرک، آلمان) رنگ آمیزی شدند (Bancroft and Gamble, 2011). در نهایت هم با استفاده از میکروسکوپ نوری (cx33، الیمپوس، آلمان)، ساختار پارانشیم تخمدان، وضعیت انواع فولیکول‌های در حال رشد شامل فولیکول‌های آغازین، اولیه، ثانویه، ثالثیه، بالغ (گراف)، فولیکول‌های آترتیک،

سلول‌های گرانولوزا و سلول‌های تک مورد مطالعه قرار گرفت.

-تحلیل آماری داده‌ها: برای انجام آنالیز آماری در مورد یافته‌های به‌دست آمده، از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین± انحراف استاندارد از میانگین (mean±SEM) بیان شده و از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one- way ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD (Least Significant Difference) برای مقایسه گروه‌ها استفاده شد. در تمامی موارد، مقدار $p<۰/۰۵$ به عنوان معیار حداقل اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مطابق داده‌های ثبت شده در جدول ۱، در پایان دوره آزمایش (روز ۲۸ درمان)، میانگین وزن موش‌های مورد مطالعه، در گروه نیکوتین در مقایسه با گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین میانگین وزن موش‌ها در گروه نیکوتین+ آلوئه‌ورا، بعد از دریافت ژل آلوئه‌ورا در مقایسه با میانگین وزن موش‌های گروه نیکوتین، افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). اما میانگین وزن موش‌ها در گروه آلوئه‌ورا در مقایسه با گروه شاهد، تفاوت آماری معنی‌داری نداشت.

جدول ۱- مقایسه وزن موش‌های صحرائی گروه‌های مختلف مورد مطالعه بر حسب گرم (میانگین ± انحراف استاندارد)

گروه‌های مورد مطالعه	وزن بدن بر حسب گرم	
	شروع آزمایش	پایان آزمایش
شاهد	۱۸٤/۵۰ ± ۳/٦۰ ^{a}	±۸۰/۲۰۷ ٦/۰۲^{a}
نیکوتین	۱۸۷/۳۰ ± ۳/۳۰ ^{a}	۱۸۹/٦۰ ± ۸/۰٦^{b}
نیکوتین + آلوئه‌ورا	۱۸۱/۲۰ ± ۵/۲۰ ^{a}	۱۹۸/۹۰ ± ۹/۰۰ ^{a}
آلوئه‌ورا	۱۸۸/٤۰ ± ۲/۵۰ ^{a}	۲۰۳/۱۱ ± ٤/٤۰^{a}

a,b,c: وجود حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

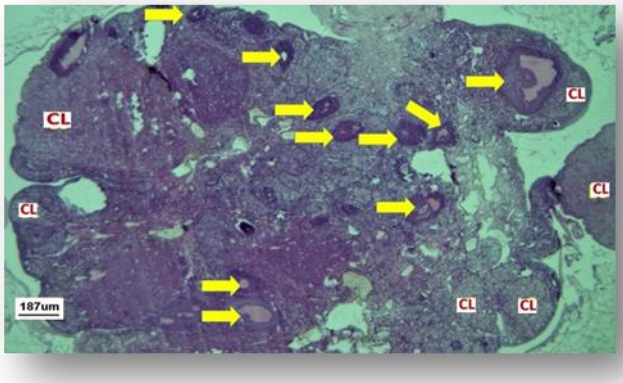
همچنین میانگین وزن تخمدان در موش‌های تیمارشده با نیکوتین، نسبت به گروه شاهد تغییر آماری معنی‌داری نداشت. میانگین وزن تخمدان موش‌های تیمارشده با نیکوتین+ آلوئه‌ورا، نسبت به میزان آن در موش‌های تیمارشده با نیکوتین و گروه شاهد نیز، دارای کاهش معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). میانگین وزن تخمدان موش‌های گروه تیمار با ژل آلوئه‌ورا هم در مقایسه با گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$) (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه وزن تخمدان موش‌های صحرائی گروه‌های مورد مطالعه برحسب گرم (میانگین ± انحراف استاندارد)

گروه‌های مورد مطالعه	وزن تخمدان بر حسب گرم
شاهد	۰/۵۱۳ ± ۰/۰۰۶ [a]
نیکوتین	۰/٤٧٦ ± ۰/۰۰۳ [a]
نیکوتین+ آلوئه‌ورا	۰/۰±٤٨٢/۰۰۲ [a]
آلوئه‌ورا	±٤٨٨/۰ ۰/۰۰۳[a]

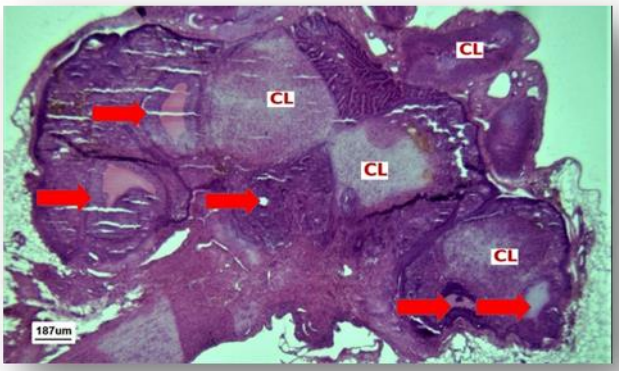
a, b, c: وجود حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

از طرف دیگر، در بررسی نمای کلی بافت تخمدان موش‌های گروه شاهد، مشاهده گردید که تخمدان از خارج توسط یک بافت پوششی مکعبی ساده کاملاً احاطه شده و در بخش قشری تخمدان، انواع فولیکول‌های در حال رشد و اجسام زرد تخمدانی مشاهده می‌گردد. در بخش مرکزی تخمدان هم، بافت همبند سست و عروق خونی بدون هیچ گونه عوارض غیرطبیعی مشاهده گردید (شکل ۱).



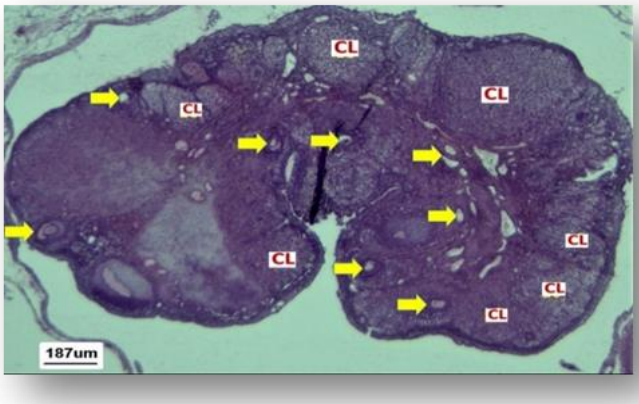
شکل ۱- نمای کلی تخمدان یک موش صحرائی سالم از گروه شاهد: انواع فولیکول‌های سالم و در حال رشد (پیکان‌های زرد رنگ) و جسم زرد جدید (CL) در بخش قشری تخمدان قابل مشاهده‌است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×٤٠٠)

اما در بررسی نمای کلی بافت تخمدان موش‌های صحرایی گروه تیمار با نیکوتین نسبت به گروه شاهد، تغییراتی ملاحظه گردید که نمایان‌گر تأثیر نیکوتین بر وضعیت بافتی تخمدان در حیوانات این گروه بود. به طوری‌که وجود التهاب و رنگ تیره‌تر مقطع بافتی در نمونه‌های گروه مذکور نسبت به گروه شاهد کاملاً مشهود بود. در ناحیه قشری هم یکدست نبودن بافت پوششی سطح تخمدان، کم تعداد بودن فولیکول‌های طبیعی جوان، در حال رشد و یا سالم، افزایش تعداد فولیکول‌های آترزی و افزایش تعداد جسم زرد قدیم، به طور واضح به چشم می‌خورد. همچنین ناحیه مرکزی تخمدان موش‌های این گروه به شدت تحلیل رفته و قسمت باقی‌مانده بسیار پرخون و ملتهب به نظر می‌رسید (شکل ۲).



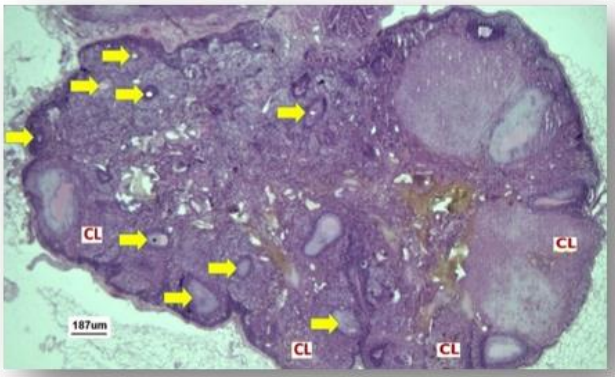
شکل ۲- نمای کلی تخمدان یک موش صحرائی در گروه تیمار با نیکوتین: وضعیت بافتی ملتهب و وجود فولیکول‌های آترزی (پیکان‌های قرمز رنگ) و جسم زرد دوره قبل (CL) قابل مشاهده‌است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۴۰۰)

در تخمدان موش‌های صحرائی گروه تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا هم، مشاهده نمای کلی تخمدان، حکایت از بهبودی شرایط بخش قشری تخمدان در برخی پارامترها، از جمله بهبودی وضعیت بافت پوششی سطحی، کاهش میزان التهاب و پرخونی، افزایش تعداد فولیکول‌های سالم و کاهش فولیکول‌های آترزی و افزایش تعداد اجسام زرد جدید بود. اما، قطر بخش قشری و تعداد کلی فولیکول‌های تخمدانی، در مقایسه با یافته‌های مذکور در موش‌های صحرائی گروه شاهد، نسبتاً کم‌تر به نظر می‌رسید. همچنین در بخش مرکزی تخمدان هرچند وضعیت پرخونی نسبت به گروه نیکوتین + آلوئه‌ورا دارای شرایط بهتری بود، اما هنوز هم نسبت به گروه شاهد میزان التهاب بیشتر بود. به همین ترتیب قطر این بخش نسبت به گروه تیمار با نیکوتین افزایش، اما نسبت به گروه شاهد هنوز هم کمتر به نظر می‌رسید (شکل ۳).



شکل ۳- نمای کلی تخمدان در موش‌های گروه نیکوتین+آلوئه‌ورا: وجود بخش قشری فعال‌تر نسبت به گروه نیکوتین و وجود فولیکول‌های در حال رشد (پیکان‌های زرد رنگ) و جسم زرد جدید (CL) قابل مشاهده‌است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۴۰۰)

در موش‌های تیمار شده با ژل آلوئه‌ورا هم وضعیت نمای کلی بافت تخمدان به وضعیت مذکور در بافت تخمدان موش‌های گروه شاهد شباهت زیادی داشت، با این تفاوت که قطر بخش قشری و مرکزی کمتر بود (شکل ٤).



شکل ٤- نمای کلی تخمدان موش صحرایی گروه آلوئه‌ورا: وجود انواع فولیکول‌های سالم و در حال رشد (پیکان‌های زرد رنگ) و جسم زرد جدید (CL) در بخش قشری تخمدان قابل مشاهده‌است (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین،درشت نمایی x ٤٠٠)

همچنین مطابق یافته‌های ثبت شده در جدول ۱، نتیجه شمارش فولیکول‌های آغازین نشان داد که میانگین تعداد این فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه تیمارشده با نیکوتین نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). تعداد فولیکول‌های آغازین در تخمدان موش‌های گروه تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا هم نسبت به گروه تیمارشده با نیکوتین، افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$)، اما تعداد فولیکول‌های مذکور نسبت به تعداد آن‌ها در تخمدان موش‌های گروه شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). اما میانگین تعداد این فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه تیمارشده با آلوئه‌ورا نسبت به تعداد آن‌ها در تخمدان موش‌های گروه شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). اما میانگین تعداد این فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه شاهد اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد.

از طرف دیگر بر اساس اطلاعات ارائه شده در جدول مذکور، میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه در تخمدان موش‌های گروه تیمار با نیکوتین نسبت به تعداد آن‌ها در تخمدان موش‌های گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). اما پس از مصرف ژل آلوئه‌ورا در موش‌های گروه تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا تعداد این فولیکول‌ها نسبت به تعدادشان در تخمدان موش‌های گروه تیمارشده با نیکوتین افزایش معنی‌داری داشت و به نتایج مربوط به گروه شاهد نزدیک شده‌بود ($p<۰/۰۵$). همچنین دریافت ژل آلوئه‌ورا در موش‌های سالم گروه تیمار با آلوئه‌ورا تغییری در میانگین تعداد فولیکول‌های اولیه تخمدان موش‌ها نسبت به گروه شاهد ایجاد نکرد (جدول ۱).

در مورد شمارش فولیکول‌های ثانویه هم، اطلاعات جدول ۱ نشان می‌دهد که تعداد این فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه تیمار با نیکوتین نسبت به تعداد آن در تخمدان موش‌های گروه شاهد کاهش آماری معنی‌داری داشته‌است ($p<۰/۰۵$). اما در موش‌های گروه تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا، با وجود این‌که تعداد فولیکول‌های مذکور پس از تیمار موش‌ها با ژل آلوئه‌ورا نسبت به گروه تیمارشده با نیکوتین افزایش آماری معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$)، اما نسبت به گروه شاهد تعداد این فولیکول‌ها دارای کاهش آماری معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). همچنین در گروه تیمار با آلوئه‌ورا نسبت به گروه شاهد تعداد فولیکول‌های فوق نشان‌دهنده کاهش آماری معنی‌داری بود ($p<۰/۰۵$). اما، مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های ثالثیه نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نبود. همچنین مقایسه میانگین تعداد فولیکول‌های بالغ هم نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مختلف نبود (جدول ۱).

جدول۳ – میانگین ± انحراف استاندارد تعداد انواع فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه	فولیکول آغازین	فولیکول اولیه	فولیکول ثانویه	فولیکول ثالثیه	فولیکول بالغ
شاهد	۱٤/۱۷±۲/۱۱^{a}	٤/۳±۱/۰٤^{a}	۸/۲ ±۰/۱^{a}	½ ±۰/۰۳۳^{a}	۱/۱±۰/۱٤۰^{a}
نیکوتین	٦/۲±۱/۲۳^{b}	۱/۳±۰/۲^{b}	۲/٦ ±۰/۳۳۱^{b}	۱/۸ ±۰/۰۱۸^{a}	۱±۰/۱۳۱^{a}
نیکوتین+ آلوئه‌ورا	۹/۰۵± ۰/۷^{c}	۳/۸±۰/٤۲٦^{a}	٤/٤ ±۱/۰۱^{c}	۱/۹ ±۰/۱۵۵^{a}	۱±۰/۱۱۷^{a}
آلوئه‌ورا	۱۲/۱±٤/۰۸^{a}	۵/۵±۰/۵٤۳^{a}	۵/۳±۰/۸۰۷^{c}	۱/۹۳ ±۱/۰۲۲ ^{a}	۰/۸±۰/۰۱۹^{a}

a,b,c: وجود حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

از طرف دیگر در مورد فولیکول‌های آترزی‌شده مطابق داده‌های جدول ۲، ارزیابی‌ها نشان داد که میانگین تعداد این دسته از فولیکول‌ها در تخمدان موش‌های گروه تیمار با نیکوتین نسبت به تعداد فولیکول‌های مذکور در تخمدان موش‌های گروه شاهد افزایش آماری معنی‌داری را داشته‌است ($p<۰/۰۵$). اما پس از تیمار موش‌ها با ژل آلوئه‌ورا، میانگین تعداد این فولیکول‌ها در گروه تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا به طور معنی‌داری کاهش یافتند ($p<۰/۰۵$). البته در گروه تیمار با آلوئه‌ورا، در مورد فاکتور فوق نسبت به گروه شاهد تغییر آماری معنی‌داری ایجاد نشده‌بود.

شمارش و مقایسه تعداد جسم زرد جدید هم در تخمدان موش‌های گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان داد که میانگین تعداد این اجسام در موش‌های گروه تیمار با نیکوتین نسبت به گروه شاهد دچار کاهش معنی‌داری شده‌بود ($p<۰/۰۵$). اما در موش‌های گروه تیمار با نیکوتین+ آلوئه‌ورا نسبت به گروه تیمار با نیکوتین، میانگین تعداد جسم زرد جدید، افزایش آماری معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). البته در موش‌های گروه تیمارشده با آلوئه‌ورا، تعداد جسم زرد جدید نسبت به گروه شاهد تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

میانگین تعداد جسم زرد دوره قبل در تخمدان موش‌های گروه تیمارشده با نیکوتین در مقایسه با گروه شاهد هم افزایش آماری معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). در موش‌های گروه تیمار شده با نیکوتین+

آلوئه‌ورا نسبت به گروه تیمارشده فقط با نیکوتین، میانگین تعداد جسم زرد دوره قبل دچار کاهش معنی‌داری شده بود ($p<۰/۰۵$). اما در موش‌های گروه تیمارشده با ژل آلوئه‌ورا در مورد فاکتور فوق، تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به گروه شاهد، حاصل نشده‌بود (جدول ۲).

جدول٤ - میانگین ± انحراف استاندارد تعداد فولیکول‌های آترزی‌شده و اجسام زرد در تخمدان موش‌های گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه	فولیکول آترتیک	جسم زرد جدید	جسم زرد دوره قبل
شاهد	۳/۲±۰/۵۳^{a}	۸/٤±۰/۳۹۵^{a}	۲/۱±۰/۲۷٦^{a}
نیکوتین	۷/٦±۰/۷۵۳^{b}	۳/۲±۰/٦۸^{b}	۷/۳±۱/۱۱^{b}
نیکوتین+ آلوئه‌ورا	٤/٦±۱/۰۸^{a}	٦/۸±۰/۱٤۷^{a}	۳/۰٤±۱/۲^{a}
آلوئه‌ورا	۲/۹±۰/٦۷۹^{a}	۷±۱/۲۵^{a}	۱/۷±۲/۲^{a}

a,b,c: وجود حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین گروه‌های مختلف می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

نیکوتین یک آلکالوئید دارویی و نیز سمی فعال و ماده‌ای اعتیادآور است که در دود سیگار نیز وجود دارد و اثرات آن بر سیستم تناسلی و باروری، بارها بررسی شده است.در مطالعه حاضر نیز تیمار موش‌ها با نیکوتین آسیب‌های متعددی از جمله کاهش وزن بدن، کاهش وزن تخمدان‌ها، التهاب بافت تخمدان، افزایش تعداد فولیکول‌های آترزی‌شده و اجسام زرد قدیمی را ایجاد کرد که دلیل آن می‌تواند افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و القاء استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از استعمال نیکوتین در بافت تخمدان و ایجاد اختلال در فولیکولوژنز باشد. گیاه آلوئه ورا نیز به دلیل داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی تا حدود زیادی از شدت آسیب ناشی از نیکوتین در بافت تخمدان موش کاسته و بهبودی ایجاد کرد. همچنین یافته‌های این مطالعه نشان داد قرار گرفتن در معرض نیکوتین و دود سیگار می‌تواند سبب افزایش خطر ناباروری با منشأ اختلالات تخمدانی شود. گزارش آزاد و همکاران در سال ۲۰۱۸ هم حاکی از این است که رادیکال‌های آزاد باعث ایجاد استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون چربی‌های غشاء سلولی و آسیب DNA می‌شوند و از علل اصلی اختلالات باروری به شمار می‌روند (Azad *et al.*, 2018). همچنین گزارش شده است،تزریق زیرجلدی نیکوتین به مدت ۲۵ روز و به میزان ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوانات در موش صحرایی ماده، موجب کاهش شدید وزن بدن و وزن تخمدان در گروه دریافت‌کننده نیکوتین نسبت به گروه کنترل شد (Sistani *et al.*, 2017). در تحقیق دیگری نیکوتین باعث توقف مصرف و یا کاهش شدید میل به غذا شد (Wack and Rodin, 1982). همچنین، نیکوتین با دخالت در تنظیمات هورمونی موجب ایجاد آسیب در دستگاه تولیدمثلی می‌شود. برای مثال نیکوتین با افزایش ترشح کاتکول آمین‌ها باعث ایسکمی گنادها و کاهش رشد آن‌ها می‌گردد (Balazadeh Kocheh and Hassanzadeh, 2014). مطالعات نشان داده است که مصرف خوراکی آلوئه‌ورا سبب افزایش رگ‌سازی در اطراف فولیکول‌های در حال رشد و همچنین افزایش وزن تخمدان در موش‌های صحرایی می‌شود (Kosif

and Aktas, 2009). در بررسی مشابه دیگر که توسط مدرسی و همکاران در سال ۱۳۹۲ در رابطه با تأثیر عصاره گیاه آلوئه‌ورا بر وضعیت اسپرماتوژنز و هورمون‌های جنسی در موش آزمایشگاهی انجام گرفت، یافته‌های به‌دست آمده بیانگر افزایش سطح هورمون‌های تولیدمثلی و نیز افزایش وزن و رشد بیضه در نتیجه تجویز خوراکی عصاره آلوئه‌ورا بود (Modaresi *et al.*, 2013). بر اساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، گیاه آلوئه‌ورا به دلیل دارا بودن ترکیبات ضد التهابی و فیتواستروژنی مانند انواع ویتامین‌ها و فلاونوئیدها، از یک طرف باعث مهار اثرات التهابی نیکوتین و از سویی دیگر باعث رشد و افزایش وزن تخمدان گردیده‌است که با مطالعات محققین پیشین مانند کوسیف و اکتاس در سال ۲۰۰۹ (Kosif and Aktas, 2009) و مدرسی و همکاران در سال ۲۰۱۳ همخوانی دارد (Modaresi *et al.*, 2013).

از طرف دیگر در مطالعه حاضر، ارزیابی‌های میکروسکوپیک نشان دهنده وجود آسیب و تغییرات شدید در ساختار بافتی تخمدان موش‌های گروه تیمارشده با نیکوتین شامل التهاب، تغییر رنگ بافت تخمدان، یکدست نبودن بافت پوششی تخمدان، کاهش فولیکول‌های سالم و افزایش فولیکول‌های آترتیک نسبت به گروه شاهد بود (شکل ۲) . در توافق با مطالعه حاضر، سیستانی و همکاران در سال ۱۳۹۶، تأثیر نیکوتین بر ساختار و فعالیت تخمدان موش صحرایی را مورد ارزیابی قرار داده و مشاهده کردند که در تخمدان موش‌های گروه دریافت‌کننده نیکوتین به میزان mg/kg ۰/۲ به ازای وزن حیوانات، تعداد فولیکول‌های در حال رشد و همچنین جسم زرد جدید، کاهش یافته و برعکس میانگین تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش یافته بود (جدول ٤). البته در مطالعه مذکور در میانگین تعداد فولیکول‌های گراف تغییر معنی‌داری ایجاد نگردید. همچنین این تغییرات با افزایش شدید میزان مالون‌دی‌آلدئید بافت تخمدان که شاخص پراکسیداسیون لیپیدی است همراه بود که نشان‌دهنده ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان در نتیجه تزریق نیکوتین می‌باشد (Sistani *et al.*, 2017). در تحقیق مشابه دیگری که توسط بالازاده کوچه و حسن‌زاده در مورد اثرات نیکوتین در دوزهای مختلف بر تخمدان موش صحرایی در سال ۱۳۹۳ انجام گرفت، گزارش کردند که با افزایش دوز نیکوتین تغییرات مخرب ساختاری در تخمدان و فولیکول‌های تخمدانی از قبیل کاهش فولیکول‌های فعال، افزایش فولیکول‌های آترتیک و کیستیک شده، افزایش جسم زرد دوره قبل و پرخونی و ادم میان‌بافتی در بخش مرکزی نیز افزایش می‌یابد (Balazadeh Kocheh and Hassanzadeh, 2014).

براساس یافته‌های به دست آمده در تحقیق حاضر، تیمار حیوانات با ژل آلوئه‌ورا به میزان mg/kg ٤۰۰ به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، در گروه نیکوتین+ آلوئه‌ورا توانست تغییرات بافتی ایجاد شده در تخمدان، متعاقب مصرف نیکوتین را تا حدود زیادی ترمیم و درمان نماید و ساختار بافتی تخمدان در این گروه را به شرایط طبیعی نزدیک نماید. در این گروه، وضعیت بخش قشری تخمدان نسبت به گروه نیکوتین کاملاً در شرایط بهتری بوده و فعالیت و عملکرد این ناحیه از تخمدان به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرده بود (شکل ۳). این بهبودی به شکل کاهش پرخونی، بهبود وضعیت بافت پوششی سطح تخمدان، افزایش تعداد فولیکول‌های

سالم و فعال، کاهش فولیکول‌های آترزی و افزایش تعداد جسم زرد جدید خود را نشان داد. در این گروه همچنین مشابه بخش قشری، بخش مرکزی تخمدان نسبت به گروه نیکوتین شرایط بهتری پیدا کرده‌بود (شکل ۳) . همسو با نتایج مطالعه حاضر، جوان معصومی و همکاران در سال ۱۳۹۵ پس از یک آزمایش، اعلام کردند که تجویز خوراکی آلوئه‌ورا به میزان ۳۰۰ mg/kg به ازای وزن حیوانات، باعث مهار استرس اکسیداتیو ایجاد شده توسط نانوذره دی اکسیدتیتانیوم و کاهش بیومارکرهای آسیب قلبی- عروقی در موش آزمایشگاهی گردیده‌است (Javan Masoumi *et al.*, 2016).

با توجه به یافته‌ها و مشاهدات در مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که نیکوتین به دلیل دارا بودن خواص التهابی و تولید رادیکال‌های آزاد و از طرفی با اختلال در مسیر تولید و تنظیمات هورمون‌های جنسی، باعث ایجاد آسیب به اجزای مهم بافت تخمدان می‌شود. به عبارت دیگر، تیمار با نیکوتین به میزان ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوانات و به مدت ٦ هفته باعث ایجاد تغییرات ماکروسکوپی از جمله کاهش وزن حیوان، کاهش وزن تخمدان و ایجاد تغییرات ظاهری در آن و نیز تخریب بافتی شدید مانند کاهش تعداد فولیکول‌های سالم و فعال، افزایش تعداد فولیکول‌های آترتیک، کاهش جسم زرد جدید و به طور کلی اختلال در فعالیت طبیعی تخمدان گردید، اما مصرف خوراکی ژل گیاه آلوئه‌ورا به مقدار ٤٠٠ mg/kg به ازای وزن بدن توانست به دلیل ترکیبات مفید خود تمامی عوارض و اختلالات میکروسکوپی و تغییرات ماکروسکوپی را بهبود ببخشد. در واقع مهار تأثیرات مخرب نیکوتین بر بافت تخمدان در تحقیق حاضر، نشان‌دهنده وجود خواص مفید و حفاظتی آلوئه‌ورا در تقابل با التهاب و استرس ایجادشده توسط نیکوتین تا حد جبران آسیب‌های وارده می‌باشد. بهبود خصوصیات مورفولوژیک بافت تخمدان در موش‌های دریافت‌کننده ژل خوراکی آلوئه‌ورا بیانگر این موضوع است که به احتمال زیاد، ژل گیاه آلوئه‌ورا توانسته است آسیب ساختاری و فولیکولی ایجاد شده ناشی از نیکوتین را درمان نموده و عملکرد طبیعی تخمدان موش‌ها را دوباره احیاء نماید.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بافت‌شناسی دامپزشکی بوده و در آزمایشگاه بافت‌شناسی دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام انجام گرفته است. از تمام کارشناسان مجرب دانشکده پیرادامپزشکی دانشگاه ایلام، همچنین مدیریت محترم مجله آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Afrogh, M., Erfani Majd, N. and Najafzadeh Varzi, H. (2016). Morphometric and immunocytochemical study of the quality and maturity of oocytes of diabetic laboratory mice following aloe vera administration. Urmia Medical Journal, 27(3): 186-178. [In Persian]
- Arabi, M. (2004). Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Andrologia, 36(5): 305-310.
- Amo Oghli Tabrizi, B., Mohajeri, D., Balila, A., Rezaei, A. and Mesgari, M. (2006). Evaluation of serum levels of calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, magnesium, total protein and albumin after complete removal of ovaries in rats. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 1(1): 49-56. [In Persian]
- Aydos, K., Gueven, M.C., Can. B. and Ergue, A. (2001). Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. BJU International, 88(6): 622-626.
- Azad, F., Nejati, V., Shalizar-Jalali, A., Najafi, Gh. and Rahmani, F. (2018). Royal jelly protects male mice against nicotine-induced reproductive failure. Veterinary Research Forum, 9(3): 231-238.
- Bahrami Tapehbor, M., Mazaheri, Y., Khaksari Mahabadi, M., Fatemi Tabatabai, S.R. and Tabandeh, M.R. (2016). Aloe vera gel improves the structural disorders of the brain of male rats with streptozotocin-induced diabetes. Journal of Isfahan Medical School, 35(422): 240-235. [In Persian]
- Balazadeh Kocheh, F. and Hassanzadeh, Sh. (2014). The effect of nicotine on histomorphology and histomorphometry of ovarian follicles in adult rats. Journal of Qom University of Medical Sciences, 8(6): 9-21. [In Persian]
- Bancroft, J.P. and Gamble, M. (2002). Theory and practice of histological techniques. 5th ed., London: New York, pp: 63-84.
- Carvalho, C., Favaro, W., Padovani, C. and Cagnon, V. (2006). Morphometric and ultrastructure features of the ventral prostate of rats (Rattus norvegicus) submitted to long-term nicotine treatment. Andrologia, 38(4): 142-151.
- Ghorbani, T., karimi, A., Najafi, Gh., Besharati, M. and Sharafi, M. (2020). Study of the effect of vitagnus castus on maturation and in vitro fertilization of mice with polycystic ovary syndrome. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 14(2): 101-113. [In Persian]
- Helen, A., Krishnakumar, K., Vijayammal, P.L. and Augusti, K.T. (2000). Antioxidant effect of onion oil (Allium cepa. Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. Toxicology Letters, 116(1-2): 61-68.
- Javan Masoumi, F., Talat Mehrabad, J. and Babri Bonab, R. (2016). Evaluation of aloe vera ethanolic extract on some biomarkers of cardiovascular diseases in mice treated with titanium dioxide nanoparticles. Journal of Animal Research and Development, 9(4): 53-43. [In Persian]
- Katzung, B.G. Master, S.B. and Trevor A.J. (2009). Basic and clinical pharmacology. 11th ed., Philadelphia: McGraw Hill, pp: 79-82.
- Kosif, R. and Aktas, R.G. (2009). Investigation of the effects of Aloe barbadensis on Rat ovaries: a preliminary study. Journal of Medicinal Food, 12(6): 1393-1397.
- Modaresi, M., Khodaei, H. and Khodadi, A. (2013). The effect of aloe vera extract on spermatogenesis and reproductive hormones in mice. Journal of Animal Biology, 6(1): 69-76. [In Persian]
- Rahmani Kahnemoei, J. (2016). The effect of passive inhalation of cigarette smoke on serum fat profile in rats. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 10(3): 245-250. [In Persian]
- Rajasekaran, S., Ravi, K., Sivagnanam, K. and Subramanian, S. (2006). Beneficial effects of aloe vera leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 33(3):232-237.
- Saleh, R.A. Agarwal, A., Sharma, R.K. Nelson, D.R. and Thomas, A.J.Jr. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. Fertility and Sterility, 78(3): 491-499.

- Sistani, S., Raiszadeh, M. and Amiri, A.A. (2017). The effect of different amounts of hydroalcoholic extract of alfalfa on the control of oxidative stress of nicotine in the ovaries of female rats. Journal of Paramedical School of Tehran University of Medical Sciences, 11(3): 3601-351. [In Persian]
- Subramanyan, S., Kumar, D.S. and Arulselvan, P. (2006). Wound healing potential of Aloe vera leaf gel studied in experimental rabbit. Asian Journal of Biochemistry, 1(2): 178-85.
- Wack, J.T. and Rodin, J. (1982). Smoking and its effects on body weight and systems of caloric regulation. The American Journal of Clinical Nutrition, 35(2): 366-380.