فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال دهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۶

ارزیابی اثر حفاظتی روغن سیاه دانه بر بافت تخمدان در موش‌های تیمار شده با نانو ذرات نقره

سید محمد علی شریعت زاده*، مژگان خواجوی جعفرآباد

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اراک، اراک، ایران

* Email:S-Shariatzadeh@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۲۹

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر روغن سیاه دانه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان کارآمد، بر بافت تخمدان در موش‌های بالغ تیمارشده با نانو ذرات نقره بود.در این مطالعه موش‌های ماده بالغ نژاد NMRI به ۴ گروه (n=۶): کنترل، نانوذرات نقره (۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز)، عصاره سیاه دانه (۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم در روز) و نانو ذرات نقره + عصاره سیاه دانه تقسیم شد. تیمار دهانی تا ۳۰ روز انجام گرفت. بعد از تیمار، تخمدان‌ها خارج و برای ارزیابی هیستولوژیکی پردازش شد. پارامترهای مورفومتریک بافت تخمدان با استفاده از تکنیک استریولوژی تخمین زده شد. داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه ارزیابی شد و (P<۰/۰۵) از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.میانگین و آزمون توکی حجم کل تخمدان، کورتکس، مدولا و جسم‌زرد و نیز میانگین تعداد کل فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۰۱). به علاوه کاهش معنی‌داری در میانگین حجم اووسیت و هسته آن در انواع مختلف فولیکول‌ها در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). تجویز همزمان روغن سیاه دانه و نانوذرات نقره اثرات نامطلوب نانوذرات نقره را بر پارامترهای فوق جبران کرد. از طرفی، میانگین تعداد انواع مختلف فولیکول‌ها در موش‌های تیمار شده با روغن سیاه دانه نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). مصرف همزمان روغن سیاه دانه ونانوذرات نقره از اثرات نامطلوب نانوذرات نقره بر بافت تخمدان موش بالغ جلوگیری نمود.

کلیدواژه‌ها: استریولوژی، تخمدان، روغن سیاه دانه، موش، نانوذرات نقره.

مقدمه

پیشرفت سریع نانو تکنولوژی و تنوع کاربردهای آن موجب شده است که مواد با ابعاد نانو بطور وسیعی مورد استفاده قرار گیرد. نانو ذرات نقره در بین نانو ذرات مختلف بیشترین مصرف را دارد، بطوریکه ۳۰ درصد محصولات حاوی نانو مواد دارای نانو ذرات نقره هستند [۳۲]. به عنوان مثال در پزشکی برای ترمیم سوختگی و زخم‌ها، بانداژهای آغشته به نانو ذرات

نقره بسیار خوب عمل می‌کنند. استفاده در ابزار و ادوات دندان پزشکی و مواد مخصوص پرکردن دندان و پروتزهای دندانی، کاربرد در وسایل جراحی و پروتزهای استخوانی، مواد و ابزار جلوگیری کننده از آبستنی، مواد ضدعفونی کننده و شوینده و درمان بیماری‌های عفونی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها از موارد دیگر استفاده از این ذرات در پزشکی می‌باشد [۳،۲۲]. در صنعت نیز نانو ذرات نقره کاربردهای زیادی دارند از جمله: در پارچه بافی، ساخت جواهرات و آلات زینتی و آرایشی، ساخت رنگ‌ها، دستگاه‌های تهویه کننده هوا، دستگاه های تصفیه کننده آب، مواد غذایی و حتی اسباب بازی ها استفاده می شوند [۳،۲۰،۳۲].

نانو ذرات نقره معمولاً کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر و شامل ۱۵۰۰۰-۲۰ اتم نقره هستند [۴]. ترکیب و شکل و اندازه های مختلف نانوذرات نقره به آن ویژگی هایی می دهد که در مقایسه با مواد شیمیایی با ترکیب مشابه اما درشت‌تر (میکرو نقره) اثرات سمی متفاوتی دارد [۲،۲۳،۲۹]. بنابراین نقره در ابعاد نانو دسترسی بیشتری به بافت‌ها، سلول‌ها و مولکول‌های بیولوژیک در بدن موجودات زنده دارد [۴]. این ذرات به لحاظ ابعاد کوچک خود دارای خواص فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی، الکتریکی و مغناطیسی خاصی هستند و ممکن است از مسیرهای متفاوت وارد بدن شوند و این موضوع تعیین خطرات مربوط به این ماده را دشوار می‌کند. نانو ذرات می‌توانند مستقیماً از طریق آب، غذا، مواد آرایشی، داروها، وسایل انتقال دارو و غیره وارد بدن شوند، در نتیجه آزادانه وارد سلول شده و می‌توانند در عملکرد طبیعی آن تداخل ایجاد کنند [۲،۱۷،۲۵].

نانو ذرات نقره ماده‌ای با سمیت زیاد می‌باشد که قادر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است [۲۹]. ROS خود می‌تواند از روش‌های مختلفی نظیر: آسیب‌رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای سیگنالینگ سلولی، تغییر در روند رونویسی ژن‌ها، و... به سلول‌ها آسیب وارد کند. بعلاوه افزایش تقسیمات سلولی، استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس یا مرگ سلولی نیز با اثرات سیتوتوکسیتی نانونقره در ارتباط است [۵]. نانونقره بر روی بسیاری از اندام‌های بدن از جمله کبد، کلیه، ریه و اندام های تولید مثلی اثر نامطلوب دارد و سیستم‌های مختلف در بدن انسان و حیوان را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در بسیاری از بافت‌های بدن انباشته شده و باعث سمی شدن آنها و در نهایت منجر به مرگ می‌شود [۲۶]، باتوجه به اینکه تخمدان نیز مانند دیگر اندام‌ها در معرض آسیب ناشی از سمیت نانوذرات نقره قرار می گیرد بررسی‌هایی در رابطه با تجمع این ذرات در تخمدان و نارسایی‌های ناشی از آن تا حدودی انجام شده است.

گیاه سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* یک گیاه دولپه، علفی، یکساله و متعلق به خانواده *Ranunculaceace* (آلاله) می‌باشد [۱،۱۰]. دانه سیاه‌دانه به عنوان بخش اصلی، دارای ترکیبات مختلفی از جمله: تیمول (TOH)، تیموکوئینون (TQ) و مشتقات آن (دی‌تیموکوئینون، تیموهیدروکوئینون)، کربوهیدرات، ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای آمینه، تانن، رزین، ساپونین، کاروتن، اسیدهای چرب اشباع (مریستیک اسید، پالمیتیک اسید) و غیر اشباع (اولئیک اسید، لینولئیک اسید) و عناصری از قبیل: روی، مس، آهن، کلسیم، سدیم و فسفر می‌باشد [۹،۳۱]. تیموکوئینون و مشتقات آن مهمترین ترکیبات فارماکولوژیکی فعال سیاه‌دانه می‌باشند. روغن سیاه‌دانه و ترکیبات فعال آن به خصوص TQ دارای خواص درمانی گسترده‌ای است، از جمله آن‌ها می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی،

تقویت کننده سیستم ایمنی بدن، ضد ویروس و ضد میکروب، ضد سرطان، محافظت کننده کبد، کاهش دهنده فشار خون، ضد آسم، ضد دیابت، خواص ضد التهابی، تنظیم کننده قاعدگی، افزایش دهنده شیر، بهبود دهنده اختلالات گوارشی و ضد درد اشاره کرد [۱،۹،۱۰].

این مطالعه به منظور تعیین اثر روغن سیاه دانه بر اثرات نانو ذرات نقره روی بافت تخمدان موش بالغ نژاد NMRI انجام شد.

کد اخلاق این مقاله به شماره IR. ARAKMU, REC.1395.125 می باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های ماده ٤ هفته‌ای، نژاد NMRI (۲±۲۷ گرم) استفاده شد. این حیوانات از موسسه پاستور در تهران تهیه و در خانه حیوانات واقع در دانشگاه اراک، در شرایط متعادل (دمای۲ ±۲۱ درجه سانتی‌گراد و نور محیطی با شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و آب و غذای کافی به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی در ٤ گروه ٦ تایی شامل کنترل، نانوذرات نقره (۳۰۰ mg/kg/day)، روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day) و روغن سیاه‌دانه + نانو ذرات نقره گروه‌بندی و به صورت دهانی تیمار شدند.

نانوذرات نقره از شرکت (US Research Nanomaterials, Inc) و روغن سیاه‌دانه از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت Merck آلمان تهیه شد. دوز نانو ذرات نقره بر اساس دوزهای مورد استفاده در تحقیقات قبلی با پیامدهای آسیب شناختی بر روی سیستم تناسلی موش ماده NMRI انتخاب شد [۷] و دوز روغن سیاه دانه [۲۷] نیز بر همین اساس انتخاب شد. در پایان دوره تیمار، ابتدا موش‌ها توسط دی اتیل اتر بیهوش وبعد از تشریح، تخمدان چپ آنها خارج و پس از وزن کردن در فیکساتیو بوئن قرار داده شد [۱۹]. لازم به ذکر است که تمامی اصول بهداشتی در نگهداری و معدوم سازی حیوانات بر اساس پروتکل اخلاقی انجام شد.

بعد ازگذشت ۲۱ ساعت ازفیکس شدن، مراحل پاساژ بافتی و تهیهٔ بلوک پارافینی در قالب‌های استوانه‌ای شکل، به روش Isector برش IUR انجام شد. برای این منظور ابتدا قالب استوانه‌ای شکل به‌صورت تصادفی روی ساعت فی (ϕ)، که به ۹ قسمت مساوی تقسیم شده بود قرار گرفت، سپس با انتخاب یک عدد تصادفی بین صفر تا ۹ در امتداد عدد انتخاب شده برش داده شد. سپس بر روی ساعت تتا (θ) طوری قرار گرفت که سطح برش خورده در طول محور ۰-۰ ساعت تتا قرار گرفت. پس از آن یک عدد تصادفی دیگر انتخاب و در امتداد آن برش داده شد [۲۱]. سپس از جهت برش دوم با استفاده از میکروتوم برش‌های ۵ میکرونی و ۲۰ میکرونی گرفته و به روش هماتوکسیلین- ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند. برای بررسی نمونه‌های تهیه شده از روش‌های استریولوژی استفاده شد.

در نهایت حجم کل تخمدان، حجم کورتکس و حجم مدولا، حجم جسم زرد با استفاده از روش کاوالیری، حجم اووسیت و هسته آن در انواع فولیکول‌های تخمدان با استفاده از روش نوکلئاتور و تعداد انواع فولیکول‌های تخمدان با استفاده از روش داسیکتور محاسبه شد.

برای محاسبه حجم کل تخمدان، از میکروسکوپ (B×41TE, Olympus, Japan) و نرم‌افزار Olysia

استفاده شد. تصویر اسلایدهای ۵ میکرونی با بزرگنمایی ٤× بر روی مانیتور انداخته شد. سپس پروب نقطه‌ای بطور تصادفی و بدون هیچ‌گونه سوگیری روی تصویر انداخته و نقاط برخورد کرده با کل تصویر تخمدان شمارش گردید. برای محاسبه حجم کورتکس، حجم مدولا و حجم جسم زرد نیز، ابتدا پروب نقطه‌ای بطور تصادفی برروی تصویر انداخته شد، سپس نقاطی که با نواحی مورد نظر برخورد کرده‌اند شمارش گردید و کسر حجمی هر یک از آن‌ها محاسبه شد. سپس کسر حجمی را در حجم فضای رفرنس ضرب نمودیم و حجم کورتکس و مدولا را بطور غیر مستقیم بدست آوردیم. برای بدست آوردن حجم جسم زرد کسر حجمی جسم زرد در حجم کورتکس ضرب شد.

برای محاسبه تعداد فولیکول‌ها از روش Optical disector و از فریم مخصوص شمارش (Unbiased Counting frame) و از دستگاه میکروکیتور HEIDEN Main ND221B) Germany) استفاده شد [۱۶]. برای محاسبه تعداد انواع فولیکول‌ها به دلیل اندازه‌های متفاوت آنها، از برش های ۲۰ میکرونی استفاده شد، به این ترتیب که به طور تصادفی ۱۲ برش انتخاب شد. سپس تمام میدان دید هر برشی با استفاده از میکروسکوپ Olympus (BX41TE) و با obj 100 بررسی شد.

برای محاسبه حجم اووسیت از روش Nucleator استفاده شد. در این روش از برش های ۲۰ میکرونی استفاده شد که بطور تصادفی ۱۲ برش انتخاب شد و سپس با فولیکول‌های هر برش با استفاده از فریم مخصوص شمارش بدون جهت‌گیری، از میدان دید انتخاب شده توسط میکروسکوپ Olympus (BX14TE) که به دوربین عکاسی(Olympus) DP12، ساخت ژاپن، مجهز بود و نرم‌افزار Olysa با ob100 عکس گرفته شد. برای محاسبه کردن حجم اووسیت، از نرم‌افزار موتیک (Motic images 2000) استفاده شد به این صورت که از مرکز هستک تا غشای اووسیت اندازه‌گیری گشته و برای حساب کردن حجم هسته، از مرکز هستک تا غشای هسته اندازه‌گیری شد.

داده‌های حاصل توسط نرم افزار (Spss v16.0) و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) و تست آماری Tukey Test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

میانگین حجم کل تخمدان، حجم کورتکس و حجم جسم زرد در موش‌های تیمار شده با نانوذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱). همچنین از مقایسه میانگین حجم کل تخمدان، حجم کورتکس و حجم جسم زرد در گروه تیماری هم‌زمان نانوذرات نقره و روغن سیاه‌دانه نسبت به گروه نانو ذرات نقره افزایش معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۱) (جدول ۱).

میانگین تعداد انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱). در گروهی که به طور هم‌زمان نانو ذرات نقره و روغن سیاه دانه را دریافت کردند کاهش تعداد فولیکول‌ها نسبت به گروه نانو ذرات نقره به‌طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد (p<۰/۰۰۱). علاوه بر این میانگین تعداد انواع فولیکولهای بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه روغن سیاه دانه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته بود (p<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

میانگین حجم اووسیت (µm3) درانواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانو ذرات نقره نسبت به تمامی گروه‌ها کاهش معنی‌داری یافته بود (p<۰/۰۰۱). گروهی که به‌صورت هم‌زمان نانو ذرات نقره و روغن سیاه دانه را دریافت نمودند این کاهش به طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد (p<۰/۰۰۱). همچنین میانگین حجم اووسیت (µm3) انواع فولیکول‌های فوق در گروه روغن سیاه‌دانه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱) (جدول ۳).

میانگین حجم هسته اووسیت (µm3) در انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانو ذرات نقره نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۰۱). همچنین در میانگین حجم اووسیت (µm3) در گروه روغن سیاه‌دانه نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۰۱). در گروهی که به صورت هم‌زمان نانو ذرات و روغن سیاه دانه را دریافت نمودند کاهش حجمی که در هسته اووسیت در فولیکول‌های بدوی، اولیه و ثانویه در گروه نانو ذرات نقره اتفاق افتاده بود، به‌طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد (p<۰/۰۰۱) (جدول ٤).

جدول۱: مقایسه میانگین حجم کل تخمدان، حجم کورتکس و جسم زرد بر حسب میلی متر مکعب در گروه‌های مختلف موش ۳۰ روز پس از تیمار با نانو ذرات نقره (۳۰۰ mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day).

گروه	حجم کل تخمدان	حجم کورتکس	حجم مدولا	حجم جسم زرد
کنترل	۲/۲٦±۰/۱۷^{a}	۱/۸۲±۰/۱۰^{a}	۰/٤۱±۰/۰۷^{ab}	۰/٤۸±۰/۱۰^{a}
نانو ذرات نقره	۱/۳۹±۰/۱۵^{b}	۱/۰۵±۰/۱۱^{b}	۰/۳۱±۰/۰۷^{a}	۰/۰۹±۰/۰٤^{b}
نانوذرات+روغن سیاه دانه	۲/۳٦±۰/٤٤^{a}	۱/۸۸±۰/۲٦^{a}	۰/٤۷±۰/۲^{ab}	۰/٤۸±۰/۱۵^{a}
روغن سیاه دانه	۲/۹۸±۰/٤٦^{c}	۲/۳۸±۰/٤۳^{c}	۰/۵٤±۰/۰۵^{b}	۰/۷±۰/۱^{c}

جدول ۲: مقایسه میانگین تعداد انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه‌های مختلف موش ۳۰ روز پس از تیمار با نانو ذرات نقره (۳۰۰ mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day).

گروه	فولیکول های بدوی	فولیکول های اولیه	فولیکول های ثانویه	فولیکول های گراف
کنترل	۱۸۳۸/۹۲±٤۲۹/۹۱^{a}	۱۲۵۳/۷۹±۲۷٦/۰۸^{a}	۹٤۵/۹٦±۱۱٤/۸۱^{a}	۹۵/۱۳±۲۵/۹۳^{a}
نانوذرات نقره	۵٦۵/۷٦±۱۳۲/۱^{b}	۳٤۰/٦٤±۸۱/۷۹^{b}	۱۲۵/۸۱±۵۲/۸۷^{b}	۲٤/٦۸±۲/٦۱^{b}
نانوذرات نقره+روغن سیاه دانه	۲۹۵۰/٤۳±۷٦۹/۵۱^{a}	۱۸٤۸/۵±٤۵۵^{c}	۱۱۵۰/۷۹±۱۳۱/۵٤^{a}	۸٦/۹٦±۱۰/۰٦^{a}
روغن سیاه دانه	۵۵۲٦/٤۲±۱۲۹۵/۷۳^{c}	۳۱۵۸/۰٤±٤۸۳/۹۱^{d}	۲۱۱۷/۳۷±۳۳۳/۳۹^{c}	۲۰٦/۱۹±۳۵/۰۵^{c}

جدول ۳: مقایسه میانگین حجم اووسیت (µm3) در انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه‌های مختلف موش۳۰ روز پس از تیمار با نانو ذرات نقره (۳۰۰ mg/kg/day) و روغن سیاه دانه (۵ ml/kg/day).

گروه	حجم اووسیت فولیکول‌های بدوی	حجم اووسیت فولیکول های اولیه	حجم اووسیت فولیکول های ثانویه	حجم اووسیت فولیکول‌های گراف
کنترل	۱۸٦٤/٤۵±۱۵۲/۷۵^{a}	٦۵۸۲۰/۰۵±۵۰٦/٦^{a}	۹۷٦۰۵/٤٤±۳۷۹۰/٤۵^{a}	۱۹۷۰۷۱/۵٦±۸۷٤۹^{a}
نانو ذرات نقره	۱٤٤۷/۸٦±۸۹/٦٦^{b}	٤۵۷٤/۷۸±۳۵۸/٤^{b}	۷٦۸۳۱/۱٦±٤۹۵۳/٦۵^{b}	۱٤٤۳۸۸/۳۱±۳۹۰٤۱^{b}
نانوذرات نقره+روغن سیاه دانه	۱۸٤۹/۷۷±۸۸/٤۸^{a}	٦۳۲۷/۳۵±٦٦۵/۱٤^{a}	۹۰۳۹٦/۷۲±٦۳۰٦/۳۹^{ab}	۱۷٦۰٤٤/٤٤±۸۲٦٦/۸^{ab}
روغن سیاه دانه	۲۲۰۸/٦۹±۲۹٤/٦٤^{c}	۸۳۰۷/٤۹±۱۷۹۷/۵۲^{c}	۱٤۰٦۵٤/٦۵±۲٤۰۸۸^{c}	۲۳۹۲۰٤/٦٤±۱۵۵۲۰^{c}

جدول ٤: مقایسه میانگین حجم هسته اووسیت(µm3) در انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه‌های مختلف موش ۳۰ روز پس از تیمار با نانو ذرات نقره (۳۰۰mg/kg/day) و روغن سیاه دانه(۵ml/kg/day).

گروه	حجم هسته اووسیت فولیکول های بدوی	حجم هسته اووسیت فولیکول‌های اولیه	حجم هسته اووسیت فولیکول‌های ثانویه	حجم هسته اووسیت فولیکول‌های گراف
کنترل	٤٥٥/٩±٣٠/٧٦[a]	٩٣٩/٩٥±٤٢/٤١[a]	٤٥٩٦/٥٧±٢٥١/٧١[a]	٦٧٦٨/٦١±٣٧١/٥٣[a]
نانو ذرات نقره	٣١٦/٩٩±٢٣/٩٦[b]	٧٩٢/٦٤±٢٩/٢٢[b]	٣٧٥٦/٣٤±١٥٩/١٨[b]	٥٨٢٥/٩٣±٢٩٤/٦٩[b]
نانوذرات نقره+روغن سیاه دانه	٤٤٤/٢٢±١٩/٨٦[a]	٩١٠/٩٥±٨٢/٩٤[a]	٤٢٧٩/٦٤±٤٤٩/٣٤[a]	٧٦٢٣/٥٥±٤٣٣/٢[c]
روغن سیاه دانه	٥٤٢/٦٢±٣٨/٧٢[c]	١٢٠٣/٤٤±١٠٥/٨٥[c]	٦٥٣١/٥٩±٧١٥/٦١[c]	١٠٣١٣/٣٢±٧٨٥/٩٢[d]

بحث

در این مطالعه تیمار موش‌های بالغ با نانو ذرات نقره به مدت ۳۰ روز سبب کاهش حجم کل تخمدان، حجم کورتکس و حجم جسم زرد گردید ولی کاهش معنی‌داری در حجم مدولا مشاهده نشد.

طبق گفته Sriram و همکارانش در سال ۲۰۱۰ به علت فعال شدن کاسپاز(Caspase 3) در اثر رادیکال آزاد حاصل از نانو ذرات نقره، این رادیکال قادر است مسیر داخلی آپوپتوز را فعال کند [۲۸] و در نتیجه فرآیند آپاپتوز موجب چروکیده و کوچک شدن سلول می‌شود و همچنین غشاء سیتوپلاسمی به صورت اجسام آپوپتوتیک در می‌آیند.

در یک بررسی که در سال ۲۰۱۳ توسط El-Nouri و همکارانش انجام شد، مشخص شد که تیمار نانوذرات نقره با دوز ۳۰۰mg/kg/day به مدت ۳۰ روز در موش‌ها از طریق تولید رادیکال‌های آزاد باعث کاهش وزن بدن، تراکم استروما همراه با خون ریزی، التهاب، نکروز، افزایش فولیکول‌های آترتیک و افزایش پاسخ به کاسپاز۳ و در نهایت آپاپتوز می‌شود [۸]. نتایج حاضر کاهش معنی‌داری در تعداد انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانو ذرات نقره نشان داد. در مطالعه Ghorbanzade و همکارانش بر روی رت‌هایی که به مدت ۳۰ روز با نانو ذرات نقره تیمار شده بودند کاهش معناداری در تعداد فولیکول‌های اولیه و ثانویه و گراف آنها مشاهده شد [۱۱،۱۲،۱۳]. طبق پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ انجام شد، مشخص شد موش‌های تیمار شده با نانوذرات نقره(۳۰۰mg/kg/day) به مدت ۳۰ روز، دچار کاهش تعداد فولیکول‌ها می‌شوند و همچنین در تعداد فولیکول های آترزی افزایش نشان می‌دهند [۸]. Syrvatka و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که نانوذرات نقره بر سلول‌های گرانولوزا اثر گذاشته و سبب مهار تکثیر سلول‌های گرانولوزا می‌شود [۳۰]. از آنجایی که سلول‌های گرانولوزا تولید استروژن در تخمدان را بر عهده دارند، با کاهش سلول‌های گرانولوزا تولید استروژن که در رشد فولیکول‌ها موثر است نیز کاهش می‌یابد در نتیجه با مهار تکثیر سلول‌های گرانولوزا تعداد فولیکول‌ها نیز کاهش پیدا می‌کند.

نتایج حاضر کاهش معنی‌داری در حجم اووسیت و هسته آن در انواع فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه و گراف در گروه نانوذرات نقره نسبت به گروه کنترل نشان داد. تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که با ورود نانوذرات نقره به داخل تخمدان، به‌علت تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و فعال شدن عوامل استرس اکسیداتیو آبشار کاسپاز ۳ (Caspase 3) فعال

می‌شود [۱۸]. سلول در طی فرایند مرگ برنامه ریزی شده دچار تغییرات ساختمانی می شود که به ترتیب عبارتند از: خروج آب از داخل سلول، متراکم شدن کروماتین، متراکم گشتن و چروکیده شدن هسته، تکه تکه شدن هسته و متلاشی شدن سلول و تبدیل آن به اجسام آپوپتوتیک [۳۳]. بنابراین این عوامل سرانجام می‌توانند رشد هسته و تکامل اووسیت‌ها را تحت تاثیر قرار دهند. Hadek (۱۹٦٦) در مطالعه‌ای اثرات توکسیک نانو ذرات نقره بر بافت تخمدان موش سوری را مورد بررسی قرار داد. نتایج این مطالعه نشان داد که نانو ذرات نقره موجب تغییرات در محتوای هسته‌ای و سیتوپلاسم تخمدان ازجمله تحلیل شبکه آندوپلاسمی و تغییر در مورفولوژی میتوکندری می‌شود [۱۴].

در این مطالعه روغن سیاه‌دانه به صورت قابل توجهی اثرات سوء ناشی از نانوذرات نقره بر روی بافت تخمدان از جمله کاهش در حجم کل تخمدان، مدولا، کورتکس و جسم زرد، را بهبود بخشید. همچنین در گروهی که به طور هم‌زمان نانوذرات نقره و روغن سیاه دانه را دریافت کردند کاهش تعداد فولیکول‌ها نسبت به گروه سم به طور معنی‌دار و در حد گروه کنترل جبران شد. حجم اووسیت و هسته‌ی آن نیز در انواع فولیکول‌ها در موش‌های تیمار شده با روغن سیاه‌دانه در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت. مدرسی و پورناجی در طی آزمایشی به مدت ۲۰ روز به موش کوچک آزمایشگاهی (Balb/c) روغن سیاه دانه دادند، آن‌ها افزایش وزن بدن، افزایش جسم زرد، افزایش فولیکوژنز و افزایش استروژن را در موش‌ها در دوز بالا مشاهده کردند [۲۴]. Danlade و همکارانش در آزمایشی به اثرات سیاه‌دانه در مقابل رادیکال‌های آزاد پرداختند و به این نتیجه رسیدند که سیاه دانه باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود و میزان تیوباربیتوریک اسید حاصل از لیپید پراکسیداسیون را کاهش می دهند [۶]. روغن سیاه دانه با دارا بودن اجزایی با خاصیت آنتی اکسیدانی مثل تیموکینون (TQ) می تواند سیستم آنتی اکسیدانی را تقویت و رادیکال های آزاد را حذف کند [۱۰].

بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده در مورد اثرات حفاظتی روغن سیاه دانه بر بافت تخمدان، دور از انتظار نیست که این روغن موجب بهبود پارامترهای فوق در مطالعه ما شده باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه تجربی، نانوذرات نقره با تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) قادر به القاء استرس اکسیداتیو در بافت تخمدان موش می‌باشد. روغن سیاه دانه به عنوان آنتی‌اکسیدان به کار رفته در این بررسی تا حدود زیادی این اثرات سوء نانوذرات نقره را جبران نمود، و حتی باعث بهبود این پارامترها نسبت به گروه کنترل شد.

تشکر و قدر دانی

این مقاله حاصل پایان نامه خانم مژگان خواجوی جعفرآباد برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست سلولی تکوینی از دانشکده علوم پایه دانشگاه اراک بود و با حمایت مالی حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک به انجام رسیده است. در ضمن از کمک‌های ارزشمند خانم نادری و همچنین آقای مهدی نوده فراهانی در این مطالعه صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

[1] Ahmad A, Husain A, Mujeeb, Khan SH, Najmi AK, Siddique NA, et al.2013."A review on therapeutic potential of Nigella sativa; A miracle herb "Asian pacific journal of tropical biomedicine. (337-52)

[2] Chen D, Xi T, Bai J. 2007.Biological Effect Induced by Nanosilver Particles: In Vivo Study. Biomed Mater; 2(3):126-28.

[3] Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD, et al. 2006. In vitro antibacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. Biomaterials; 27(32): 5512-7.

[4] Chen X. Schluesener HJ. 2008. Nanosilver: a nanoproduct in medical application. Toxicol Lett; 176(1): 1-12.

[5] Cristina B, Ivan I, Pache Co, Robbie K.2007.Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointer phases; 2,No 4

[6] Danladi J, Abdulsalam A, Timbuak J, Ahmed S, Aa M, Dahiru A. 2013. Hepatoprotective effect of black seed (Nigella sativa) oil on carbon tetrachloride (ccl4) induced liver toxicity in adult wistar rats. J Dental Med Sci; 4:56-62.

[7] Elnoury M. A. H, Azmy O. M, Elshal A. O. I, Mohamed A, Ragab H, Elsherbini E. S. A. M, 2013,"Study of the Effects of Silver Nanoparticles Exposure on the Ovary of Rats". Life Science Journal, Vol. 10.

[8] Elnoury MAH, Azmy OM, Elshal AOI, Mohamed A, Ragab H, Elsherbini E-SA-M. 2013. Study of the Effects of Silver Nanoparticles Exposure on the Ovary of Rats. Life Science Journal, 10(2).

[9] Gali-Muhtasib H, EL – Najjar N, S chneider – stock R. 2006. "The medicinal potential of Black seed and its components" .Advances in phytomedicine (33-53).

[10] Ghlissi Z., Hamden K., Saoudi M., Sahnoun Z , Zeghal KM., El Feki A., et al. 2012. " Effect of Nigella Sativa seeds on reproductive system of male diabetic rats "African journal of pharmacy and pharmacology;6(20): (1444-50).

[11] Ghorbanzadeh V, Moshtaghian S, Habibian S, Ebadi A. 2011. Influence of Nano-Silver on primary follicles of ovary via intraperitoneal injection in rats. World Journal of Zoology; 6(2): 215-6.

[12] Ghorbanzadeh V, Moshtaghian SJ, Habibian S, Ebadi AG. 2011. Influence of nano-silver on graffian follicles via intraperitoneal injection in rats. Middle-East J Sci Res; 8(1):228-30.

[13] Ghorbanzadeh V, Moshtaghian SJ, Habibian S, Ebadi AG, Vandechali OB. 2012. Influence of nanosilver on secondary follicles of ovary via intraperitoneal injection in rats. European Journal of Experimental Biology; 2 (4): 1367-9.

[14] Hadek R. 1966. Preliminary report on the cellular effect of intravital silver in the mouse ovary. Journal of ultrastructure research; 15(1):66-73.

[15] Hassan SF, Abdel-Fattah SA, Elsalmoney AE.2009. Relationship between some serum enzyme activities, liver functions andbody weight in growing local chickens. International Journal of Poultry Science; 8(7):700-705.

[16] Howard C, Reed M. 1998. Unbiased stereology: Three dimentional measurement in microscopy; 133-137. BIOS Scientific Publishers, UK.

[17] Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, et al. 2008. The Apoptotic Effect of Nanosilver Is Mediated by a ROS-and JNKDependent Mechanism Involving the Mitochondrial Pathway in NIH3T3 Cells. Toxcol Lett; 179(3):130-9

[18] Johnson A. 2003. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. Animal reproduction science; 78(3):185-201.

[19] Kiernan J. A. 1999. "Histological and histochemical methods: theory and practice." Shock, 12(6): 479.

[20] Lee KJ, Nallathamby PD, Browning LM, Osgood CJ, XU XGN. 2007. In vitro imaging of transport and biocompatibility of single Silver nanoparticles in early development of Zebra fish embryos. ACS Nano; 1: 133-43.

[21] Mandarim-de-Lacerda C. A. 2003. "Stereological tools in biomedical research." Anais da Academia brasileira de Ciências 75(4): 469-486.

[22] McAuliffe ME, Perry MJ. 2007. Are nanoparticles potential male reproductive

toxicants? A literature review. Nanotoxicol; 1(3): 204-10.
[23] Moaddab S, AhariH,Shahabzade D. 2011. Toxicity study of nanosilver on osteoblast cancer cell line. IntNanoLett; 1(1):11-16.
[24] Modaresi M. Poor-Naji N. 2012. The effect of black seed (Nigella sativa) hydro-alcoholic extract on breeding factors in female mice. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences; 13(6):63-70.
[25] Oberdorster G, Oberdorster E, Oberdorster J. 2005.Nanotxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ Health Perspect; 113(7): 823-39.
[26] Parka E, Bae E, Yi J , Kim Y ,Choi K , Lee SH, et ah. 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. Environ Toxicol Pharmacol; 30(2): 162-8.
[27] shariatzadeh MA Hajjan karahroodi A. 2015. Evalution of the effect of Nigella sativa oil on sperm parameters inadultNMRI mice treated with bisphenol A.(AMUJ)، 17(93):47-55.
[28] Sriram MI, Kanth SBM, Kalishwaralal K, Gurunathan S. 2010. Antitumor activity of silver nanoparticles in Dalton's lymphoma ascites tumor model. Int J Nanomedicine5(1):753-62.
[29] Stebounova L, Adamcakova-Dodd A, Sung Kim J. 2011. Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model. Particle and Fibre Toxicology, 1-12.
[30] Syrvatka V. J, Slyvchuk Y. I, Rozgoni I. I, Gevkan I. I, Shtapenko O. V. 2015. Effect of Silver nanoparticles on maturation of rabbit's oocytes co-cultured with granulosa cells in vitro. Institute of Animal Biology NAAS of Ukraine; 57-66.
[31] Toma C. C, Simu G. M, Hanganu D, Olah N, Vata F, Hammami C, Hammami M. 2013."Chemical composition of the tunisian Nigella sativa". Note II. Profile of fatty oil, Farmacia, Vol. 61, pp. 454-458
[32] Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW. 2009.Nano-silver: A review of available data and knowledge gaps in human and enviromental risk assessment. Nanotoxicol; 3(2): 109-38.
[33] Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. 2001. The machinery of programmed cell death. Pharmacology & therapeutics; 92(1):57-70.