اثرات روی و ملاتونین بر سطح هورمون استروژن و پارامترهای فولیکولی تخمدان در موش‌های صحرایی ماده

فریبا رحیمی[۱]، **مرتضی زنده دل**[۲]، محمدجعفر رضایی[۳]، بیتا وزیر [۴]، شاهین فکور[۵]

۱-گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲-استاد گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. نویسنده مسئول zendedel@ut.ac.ir

۳- دانشیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۴-استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۵- دانشیار گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اهمیت فرآیند تولیدمثل در تداوم نسل بشر و افزایش تولیدات دامی، محققان را بر آن داشته است تا تحقیقات گسترده‌ای با هدف شناسایی عوامل و ترکیبات مؤثر بر بازدهی تولیدمثل انجام دهند. در این راستا، در مطالعه کنونی به بررسی اثرات تجویز ملاتونین و روی به‌طور جداگانه یا توأمان بر سطح هورمون استروژن و پارامترهای فولیکولی تخمدان در موش‌های صحرایی ماده می‌پردازیم.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۵ سر موش صحرایی ماده بالغ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۷ تکرار و قرارگیری دو موش در هر قفس توزیع شدند و به شرح مقابل به‌مدت ۲۰ روز از طریق گاواژ تحت درمان قرار گرفتند: گروه کنترل-۱: جیره پایه، گروه کنترل-۲: نرمال سالین، گروه تیمار-۱: روی (۴۰ppm)، گروه تیمار-۲: ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار-۳: ملاتونین+ روی. پس از انجام این مراحل، سرم و مقاطع بافتی تخمدان نمونه‌ها از نظر تغییرات هورمونی و هیستوپاتولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: براساس یافته‌ها، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین+ روی، میانگین قطر سلول‌های گرانولوزا در مقایسه با گروه‌های کنترل به طور معنی داری افزایش یافت ($P<0.05$). همچنین میانگین قطر فولیکول‌های بالغ و میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال در موش‌های دریافت کننده ملاتونین نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی داری داشت ($P<0.05$). با این حال، تجویز روی و ملاتونین به تنهایی و یا به‌طور نوأمان تأثیر معنی‌داری بر سطح هورمون استروژن بر جای نگذاشت ($P\geq0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که تجویز ملاتونین به‌تنهایی یا به‌همراه روی، پارامترهای فولیکولی تخمدان در موش‌های صحرایی ماده را بهبود می‌بخشد اما تأثیری بر سطح هورمون استروزن ندارد.

کلمات کلیدی: استروژن، موش صحرایی ماده، ملاتونین، روی

مقدمه

ملاتونین (N-استیل-۵-متوکسی تریپتامین) که در ابتدا با اثرگذاری بر تنظیم چرخه‌های تولیدمثلی شناخته شد، با تأثیر بر سیستم قلبی-عروقی و کاهش حرارت از طریق تبخیر، نقش مهمی در کاهش استرس نیز ایفا می‌کند (۱). علاوه بر این، مشخص شده است که ملاتونین نمایش ژنومی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را در ارگانیسم‌ها تغییر می‌دهد. نتایج مطالعات متعدد حاکی از نقش این هورمون در کنترل بسیاری از فرآیندهای جنسی مانند بلوغ، فعالیت تخمدان و بارداری بوده است (۲-۴). از سوی دیگر، اخیراً خواص آنتی اکسیدانی ملاتونین نیز مشخص شده است. محققان ثابت نمودند که افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در طی لقاح آزمایشگاهی (IVF) بر درصد نتایج حاصل از IVF تأثیر منفی می‌گذارد (۵). به همین دلیل، تلاش‌هایی مبنی‌بر استفاده از مزایای ملاتونین برای بهبود بازدهی تولیدمثل صورت گرفته است. به‌عنوان مثال در یکی از این تحقیقات انجام شده بر روی نمونه‌های انسانی، تجویز ملاتونین آسیب اکسیداتیو ناشی از ROS به میتوکندری اسپرم را کاهش داد. در تمام موجودات زنده، ملاتونین در طول شب توسط غده پینه‌آل، شبکیه چشم، دستگاه گوارش و اندام‌های مختلف دیگر تولید می شود (۶). میزان سنتز ملاتونین تحت تأثیر عوامل محیطی (مانند نور) و عوامل فیزیولوژیکی (مانند سن) قرار دارد. تحقیقات نشان داده است که ظرفیت تولیدمثل و تولید سلول‌ها و هورمون‌های جنسی با افزایش سن کاهش می‌یابد که این وضعیت اثرات منفی بر میزان باروری و کیفیت تخمک تأثیر بر جای می‌گذارد (۷, ۸). در زنان بالغ، به‌تدریج از کیفیت تخمک ها کاسته می‌شود و تغییرات دژنراتیوی در تخمدان روی می‌دهد، به طوریکه این شرایط می‌تواند منجر به ناباروری و/یا کاهش بازده باروری در زنان گردد (۹). در این راستا، می‌توان از نتایج مطلوب تحقیقات انجام‌شده روی حیوانات آزمایشگاهی، برای شناسایی درمان‌های نوین انسانی استفاده نمود و گامی در جهت کاهش و یا رفع بخشی از مشکلات مرتبط با ناباروری برداشت. امروزه اگرچه هورمون‌درمانی، تجویز داروهای مقلد هورمون‌های جنسی و نیز انواع تکنیک‌های کمک باروری، تلقیح داخل رحمی، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) و IVF به طور گسترده‌ای به‌منظور بهبود وضعیت باروری مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰)، اما بایستی به این نکته توجه نمود که کمیت و کیفیت تخمک‌ها تحت تأثیر پارامترهایی مانند وضعیت فرهنگی و اقتصادی، سن، تغذیه و عوامل ژنتیکی قرار می‌گیرد و هرگونه تغییر نامطلوب در این عوامل منجر به کاهش راندمان تولیدمثلی می‌شود.

روی یکی از مهمترین عناصر معدنی است که در مقادیر اندک برای تنظیم عملکرد هورمون‌های جنسی، هورمون رشد، هورمون‌های T4 و T3، بهبود تولیدمثل و سیستم ایمنی در حیوانات مزرعه و انسان ضروری می‌باشد (۱۱). علاوه‌بر این، روی در رشد و تکامل سلولی نقش دارد و وجود آن برای عملکرد مناسب سایر مولکول‌های زیستی ضروری است (۱۲). کمبود روی می تواند منجر به اختلال در رشد و نمو و علائمی همچون اسهال مزمن، آلوپسی، اختلالات چشایی، نارسایی ایمنی، اختلالات عملکردی مغز، اختلال در بهبود زخم، از دست دادن اشتها، التهاب مزمن، بیماری کبدی و تغییرات روانی مانند بی‌ثباتی عاطفی، تحریک پذیری و افسردگی را در پی داشته باشد (۱۳). اگرچه این عنصر در سطح میلی‌گرم برای بدن موردنیاز است ولی همانطور که پیش‌تر ذکر شد نقشی اساسی در حیات موجودات زنده ایفا می‌کند و در ساختمان حدود ۲۵۰ تا ۳۰۰ آنزیم به‌عنوان کوفاکتور حضور دارد (۱۴).

از سال ۱۹۶۰ داروهای متعددی برای تحریک تخمک‌گذاری و درمان انواع ناباروری در انسان مورد استفاده قرار گرفته‌اند و حتی در سال‌های اخیر استفاده از این داروها افزایش یافته است. به طور خاص تحقیقات گسترده‌ای پیرامون خواص بهبود دهنده آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند پلی‌فنول‌ها، کاروتنوئیدها، آنتی اکسیدان‌های با وزن مولکولی کم (گلوتاتیون، اسید اوریک) و ویتامین‌ها صورت گرفته است (۱۵). با این وجود، همچنان ناهماهنگی‌ها و نتایج متناقضی در گزارشات علمی وجود دارند. بنابراین، مطالعه بر روی ترکیبات جدید با هدف دستیابی به درمان‌های نوین ناباروری می‌تواند مثمر ثمر واقع گردد. با توجه به جستجوی نویسندگان، پیش از این هیچ تحقیق علمی به ارزیابی اثرات روی و ملاتونین بر سطح هورمون استروژن و پارامترهای فولیکولی

تخمدان در موش‌های صحرایی ماده نپرداخته است و مطالعه حاضر برای نخستین بار، به منظور بررسی این موضوع طراحی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

شرایط نگهداری حیوانات و طراحی آزمایش

مطالعه حاضر در مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج انجام شد و تمامی مراحل آزمایشات مورد ارزیابی و تائید کمیته این مرکز قرار گرفت. به طورکلی، برای انجام این مطالعه تعداد ۳۵ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با میانگین وزن ۲۴±۲۲۵ گرم از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی سنندج تهیه گشت. موش‌ها، در یک اتاق با نور کنترل‌شده (۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی)، سطح رطوبت ۵±۵۰ درصد و دمای ۱±۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بازه زمانی این مطالعه ۲۰ روز بود و در طی این مدت، تمامی موش‌ها دسترسی یکسانی به جیره معمولی و آب اشامیدنی داشتند. به‌منظور انجام آزمایشات، موش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی (CRD) با هفت تکرار (۷ سر) در پنج گروه آزمایشی تقسیم شدند و روزانه از طریق گاواژ به شرح زیر تحت درمان قرار گرفتند: گروه کنترل-۱: جیره پایه، گروه کنترل-۲: نرمال سالین، گروه تیمار-۱: روی (۴۰ppm)، گروه تیمار-۲: ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گروه تیمار-۳: ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) + روی (۴۰ppm). لازم به ذکر است تمامی داروها از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند و دوز داروهای تجویزی بر اساس مطالعات پیشین تعیین گردید (۱۶).

جمع‌آوری نمونه خونی و اندازه‌گیری سطح استروژن

۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌ها بین ساعت ۸ تا ۱۲ صبح انتخاب و با استفاده از اتر بیهوش شدند. سپس توسط یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری خونگیری از قلب آن‌ها انجام شد. سرم خون با سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور، ۱۵به مدت دقیقه) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جدا گشت و تا زمان اندازه‌گیری هورمونی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس سطح هورمون استروژن براساس پروتکل مندرج بر روی کیت الایزا (کمپانی رویال، لندن، انگلستان) اندازه‌گیری گردید (۱۷).

مطالعه هیستوپاتولوژی فولیکول‌های تخمدان

پس از کالبدگشایی، به‌منظور تهیه نمونه بافتی، تخمدان‌ها در ظروف حاوی فرمالین بافر ۱۰ درصد (شرکت مرک آلمان) جهت پایدار شدن قرار گرفتند. پس از تثبیت نمونه‌های بافتی، ادامه مراحل در دستگاه اتوتکنیکون طی شد و از آنها قالب‌های پارافینی تهیه گردید. با استفاده از میکروتوم، از قالب‌های پارافینی برش‌های ۵ میکرومتری تهیه و از هر ۸ برش، یک مقطع انتخاب و از آن اسلاید تهیه گردید. سپس لام‌ها با روش هماتوکسیلین- ائوزین (شرکت مرک آلمان) رنگ‌آمیزی شدند و با استفاده از مکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸). به‌طورکلی تعداد برش‌های شمارش‌شده از هر تخمدان در نمونه‌های مورد آزمایش حدود ۴۰ برش بود.

ارزیابی آماری

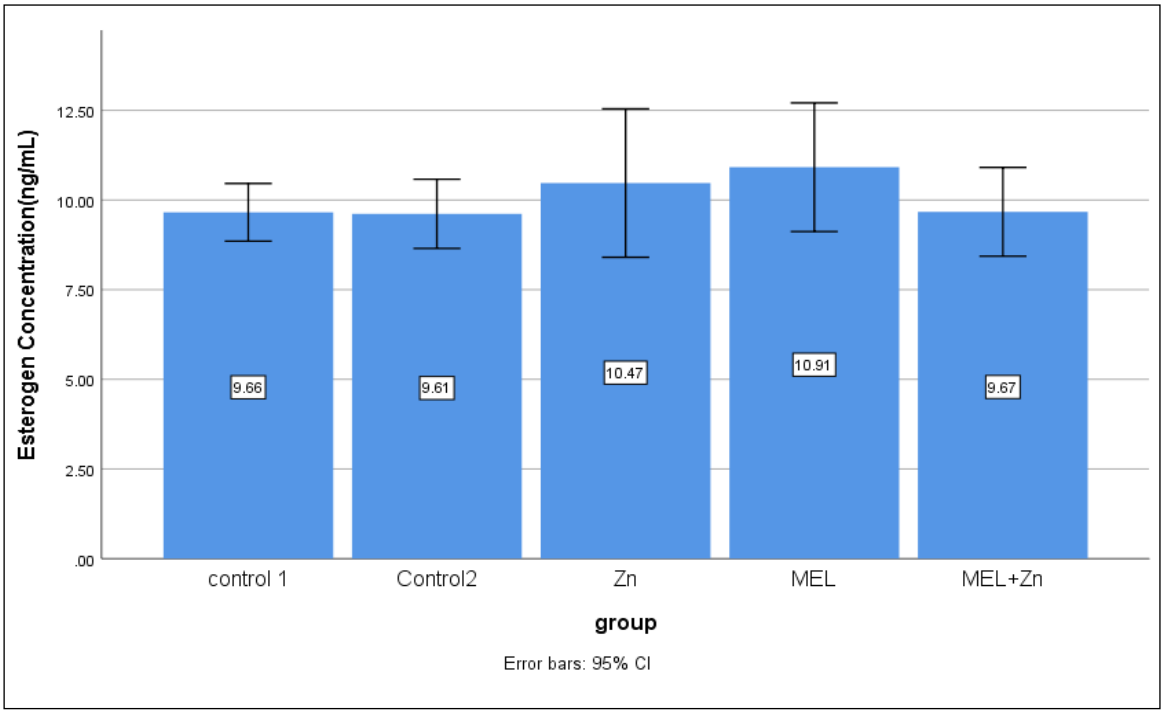
تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۲/۰۰) انجام شد. میانگین و انحراف معیار برای هر متغیر تعیین و برای ارزیابی تفاوت بین تیمارها از روش تحلیل واریانس دوطرفه ANOVA استفاده شد. لازم به ذکر است، $P< 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری تغییرات مد نظر قرار گرفت.

نتایج

بررسی هورمونی

سطح هورمون استروژن

همانطور که در نمودار-۱ نشان داده شده است، میانگین سطح هورومون استروژن ۹,۶۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر در گروه کنترل-۱، ۹,۶۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر در گروه کنترل-۲، ۱۰,۴۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر در گروه دریافت‌کننده روی، ۱۰,۹۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر در گروه دریافت‌کننده ملاتونین و ۹,۶۷ نانوگرم بر میلی‌لیتر در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین بود. براساس این نتایج تفاوت معنی‌داری در سطح استروژن تیمارها مشاهده نشد. شایان ذکر است که میانگین سطح استروژن در موش‌های دریافت‌کننده ملاتونین بیشتر از سایر تیمارها بود، اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P \geq 0.05$).

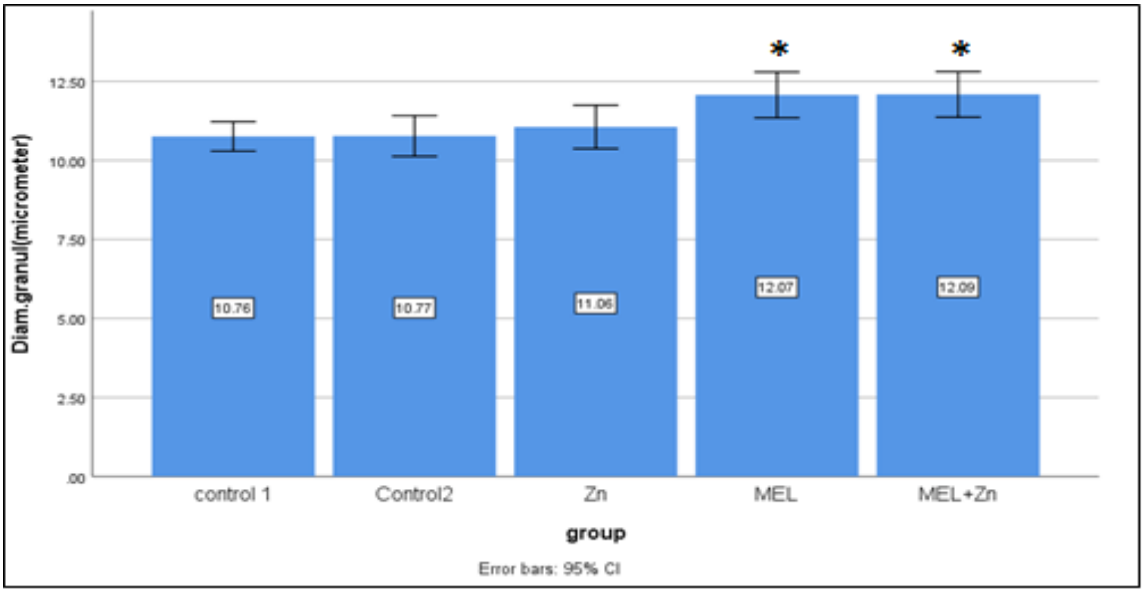


نمودار ۱-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین غلظت استروژن در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند.

بررسی هیستوپاتولوژی

قطر سلول‌های گرانولوزا

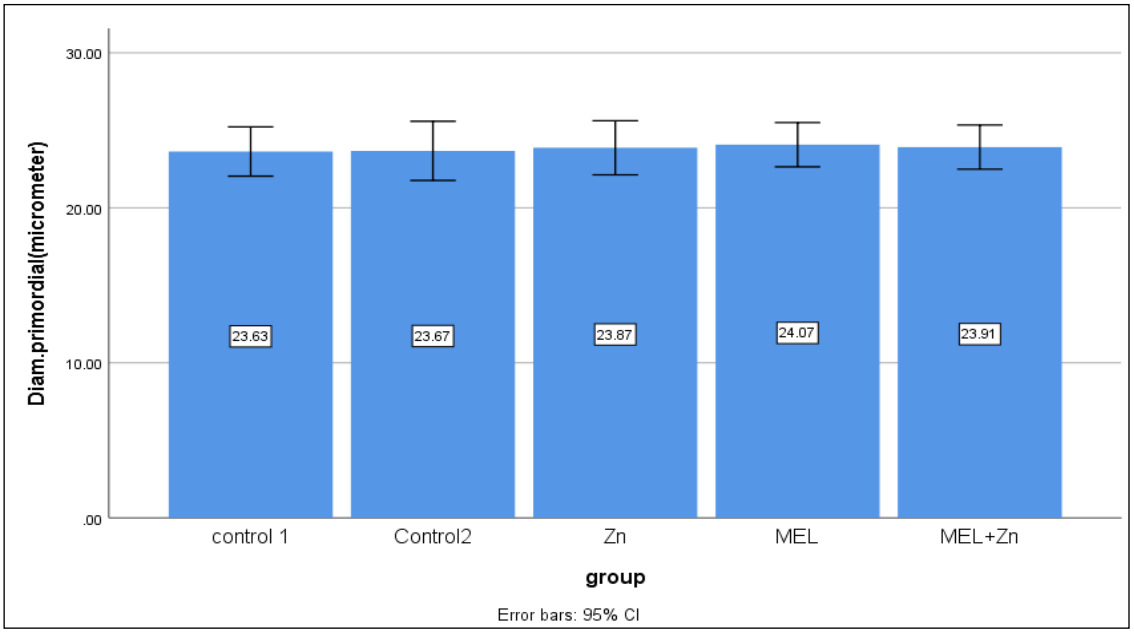
براساس نمودار-۲، میانگین قطر سلول‌های گرنولوزا در گروه کنترل-۱ برابر با ۱۰,۷۶ میکرومتر، در گروه کنترل-۲ ۱۰,۷۷ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۱۲,۰۷ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده روی ۱۱,۰۶ میکرومتر و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۱۲,۰۹ میکرومتر می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، در گروه‌های دریافت کننده ملاتونین و روی + ملاتونین میانگین قطر سلول‌های گرانولوزا نسبت به گروه‌های کنترل افزایش یافته است ($P< 0.05$).



نمودار ۲-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین قطر سلول‌های گرانولوزا در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند(* $P< 0.05$).

قطر فولیکول‌های بدوی

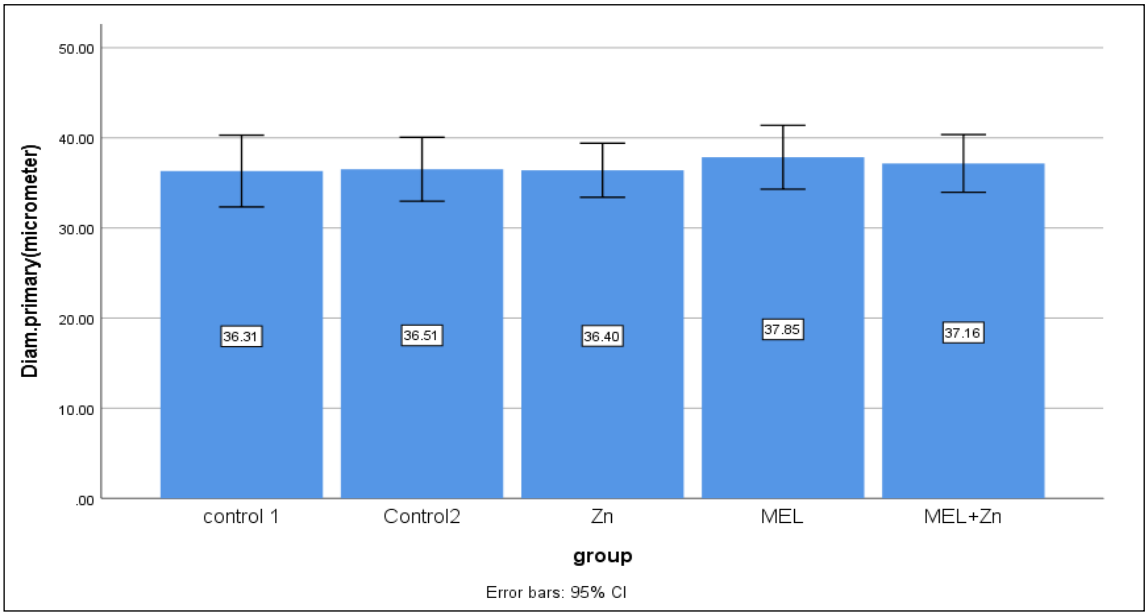
همانطور که در نمودار-۳ نشان داده شده است، میانگین قطر فولیکول‌های بدوی در گروه کنترل-۱ برابر با ۲۳,۶۳ میکرومتر، در گروه کنترل-۲ ۲۳,۶۷ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۲۴,۰۷ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده روی ۲۳,۸۷ میکرومتر و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۲۳,۹۱ میکرومتر می‌باشد. نتایج حاصل از ازمون آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف از نظر میانگین قطر فولیکول‌های بدوی وجود ندارد ($P\geq0.05$).



نمودار ۳-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین قطر فولیکول‌های بدوی در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند.

قطر فولیکول‌های اولیه

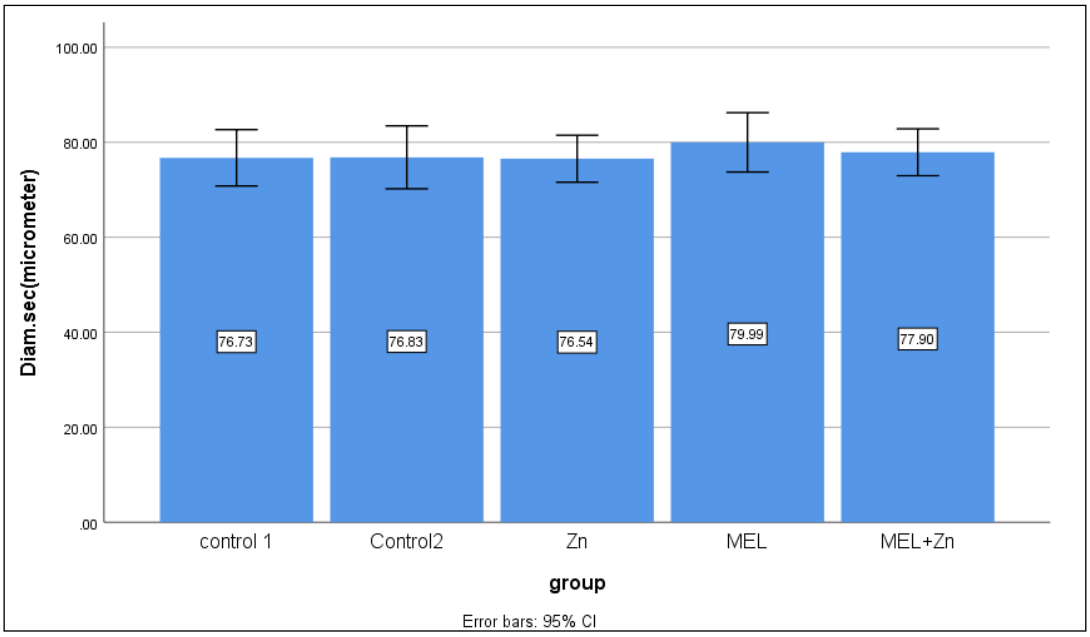
میانگین قطر فولیکول‌های اولیه در گروه کنترل-۱ برابر با ۳۶,۳۱ میکرومتر، در گروه کنترل-۲ ۳۶,۵۱ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۳۷,۸۵ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده روی ۳۶,۴۰ میکرومتر و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۳۷,۱۶ میکرومتر می‌باشد. بررسی نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های مختلف از نظر میانگین قطر فولیکول‌های اولیه وجود ندارد ($P\geq0.05$) (نمودار-۴).



نمودار ۴-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین قطر فولیکول‌های اولیه در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند.

قطر فولیکول‌های ثانویه

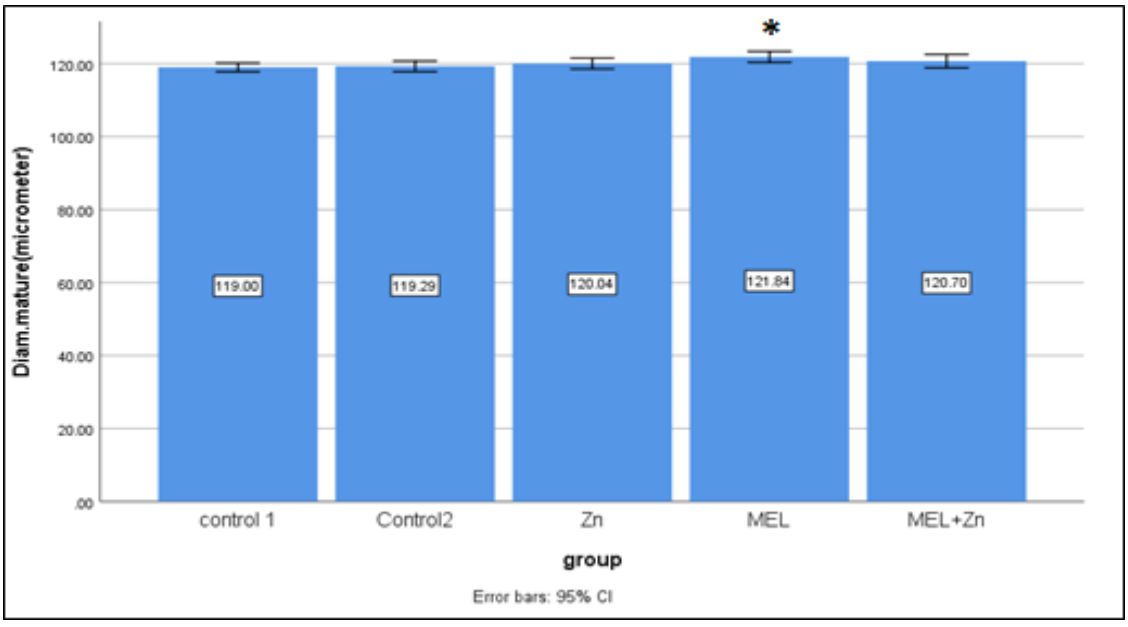
مطابق با نمودار-۵، میانگین قطر فولیکول‌های ثانویه در گروه کنترل-۱ برابر با ۷۶,۷۳ میکرومتر، در گروه کنترل-۲ ۷۶,۸۳ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۷۹,۹۹ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده روی ۷۶,۵۴ میکرومتر و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۷۷,۹۰ میکرومتر می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها حاکی از آن بود که تفاوت معنی‌داری بین گروه های مختلف از نظر میانگین قطر فولیکول‌های ثانویه وجود ندارد ($P\geq0.05$).



نمودار ۵-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین قطر فولیکول‌های ثانویه در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند

قطر فولیکول‌های بالغ

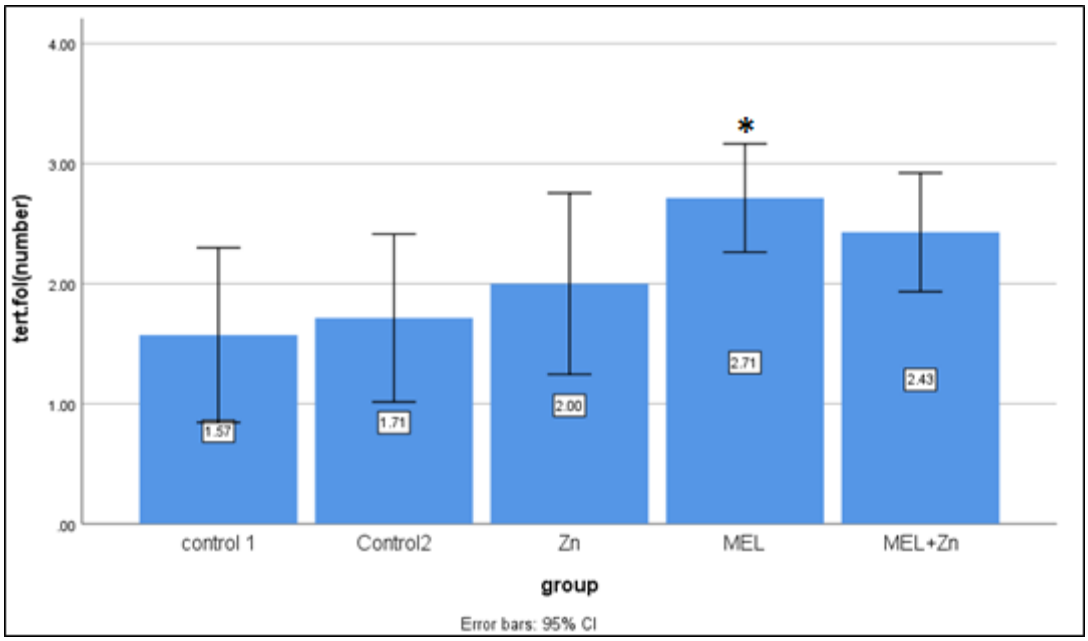
براساس نمودار-۶، میانگین قطر فولیکول‌های بالغ در گروه کنترل-۱ برابر با ۱۱۹ میکرومتر، در گروه کنترل-۲ ۱۱۹,۲۹ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۱۲۱,۸۴ میکرومتر، در گروه دریافت‌کننده روی ۱۲۰,۰۴ میکرومتر و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۱۲۰,۷۰ میکرومتر می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در گروه دریافت کننده ملاتونین میانگین قطر فولیکول‌های بالغ نسبت به گروه‌های کنترل افزایش یافته است ($P< 0.05$).



نمودار ۶-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین قطر فولیکول‌های بالغ در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند($P< 0.05$ *).

تعداد فولیکول‌های آنترال (ثالثیه)

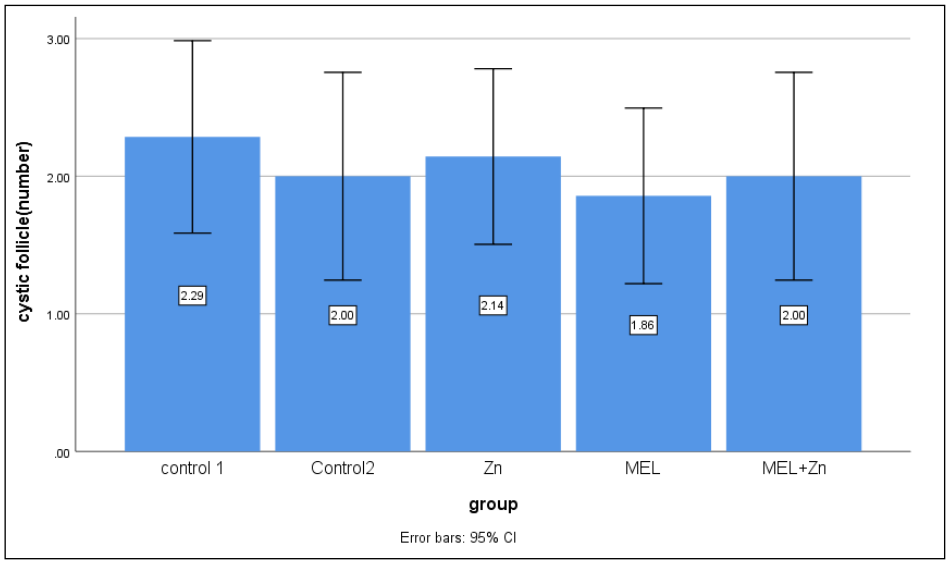
میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال در گروه کنترل-۱ برابر با ۱,۵۷، در گروه کنترل-۲ ۱,۷۱، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۲,۷۱، در گروه دریافت‌کننده روی ۲ و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۲,۴۳ می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال در گروه دریافت کننده ملاتونین در مقایسه با گروه‌های کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P< 0.05$) (نمودار-۷).



نمودار ۷-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین تعداد فولیکول‌های ثالثیه در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند ($P< 0.05$ *).

تعداد فولیکول‌های کیستیک

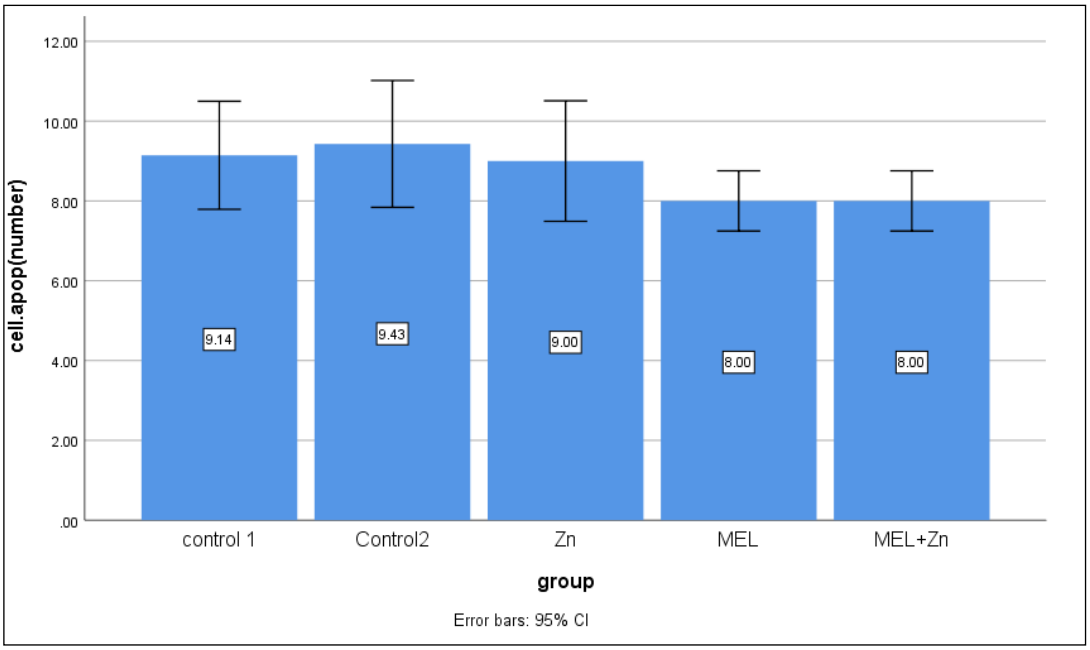
همانطور که در نمودار-۸ نشان داده شده است، میانگین تعداد فولیکول‌های کیستیک در گروه کنترل-۱ برابر با ۲,۲۹، در گروه کنترل-۲ ۲، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۱,۸۶، در گروه دریافت‌کننده روی ۲,۱۴ و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۲ می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد که تفاوت معنی داری بین گروه‌های مختلف از نظر میانگین تعداد فولیکول‌های کیستیک وجود ندارد ($P\geq 0.05$).



نمودار ۸-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین تعداد فولیکول‌های کیستیک در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند.

تعداد سلول‌های آپوپتیک

میانگین تعداد سلول‌های آپوپتیک در گروه کنترل-۱ برابر با ۹,۱۴، در گروه کنترل-۲ ۹,۴۳، در گروه دریافت‌کننده ملاتونین ۸، در گروه دریافت‌کننده روی ۹ و در گروه دریافت‌کننده روی + ملاتونین ۸ می‌باشد. براساس نتایج، میانگین تعداد سلول‌های آپوپتیک در گروه کنترل بیشتر از سایر گروه‌ها است ولی این تفاوت از نظر آماری معنی دار نمی‌باشد ($P\geq0.05$).



نمودار ۹-اثرات روی (۴۰ppm)، ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و روی (۴۰ppm) + ملاتونین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بر میانگین تعداد سلول‌های آپوپتیک در موش‌های صحرایی ماده (تعداد موش‌های صحرایی در هر گروه آزمایشی= ۷ سر). داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین بیان شدند.

بحث

فرآیندهای مختلف تولیدمثلی در جنس ماده، از جمله بلوغ، رشد فولیکول‌های تخمدانی، تخمک گذاری، لوتئینیزاسیون، لقاح، لانه گزینی، بارداری، زایمان و یائسگی، تغییرات بسیار پویایی را در برمی‌گیرند که توسط عملکرد سیستم اندوکرین و اثرگذاری هورمون‌های متنوع تنظیم می‌گردند (۱۹). ملاتونین به‌عنوان یک نوروهورمون به‌طور عمده از غده پینه‌آل ترشح می‌شود و علاوه بر تولیدمثل بر سایر عملکردهای عمومی بدن همچون ریتم شبانه‌روی، متابولیسم لیپیدها، متابولیسم قندها و تنظیم ایمنی اثر می‌گذارد. به نظر می‌رسد ملاتونین با تنظیم محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد در شکل‌گیری بلوغ و عملکرد تولیدمثلی نقش داشته باشد. مشخص شده است که سطح ملاتونین خون در دوران بلوغ به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۰). همچنین محققان ثابت کردند که با افزایش سن از تولید ملاتونین کاسته می‌شود و برداشتن غده پینه‌آل (پینه آلکتومی) منجر به تسریع بسیاری از جنبه های روند پیری می‌گردد. این یافته‌ها حاکی از اثرات ضدپیری ملاتونین هستند (۲۱-۲۳). از سوی دیگر، مشخص شده است که ملاتونین یک پاک‌کننده قوی رادیکال‌های آزاد و یک آنتی اکسیدان با طیف عملکردی گسترده است (۲۳). گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در انواع فرآیندهای سلولی مختلف، از پاسخ های فیزیولوژیکی تا پاتولوژیک درگیر می‌باشند. این ترکیبات واسطه‌های مهم واکنش‌های التهابی هستند و گزارش شده است که در تخمک گذاری نیز نقش دارند (۲۴). ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های اندوتلیال عروقی در فولیکول‌ها قرار دارند و گونه‌های فعال اکسیژن توسط این سلول‌ها در طی تخمک گذاری تولید می‌شوند. اگرچه این ترکیبات در پارگی فولیکول در حین تخمک‌گذاری نقش دارند، اما می‌توانند به طور بالقوه به سلول‌های تخمک و گرانولوزا که تحت لوتئینیزاسیون قرار می‌گیرند، آسیب برسانند (۲۵). گزارش شده است که ROS با مهار آنزیم‌های استروئیدوژنیک و پروتئین‌های حامل درون سلولی که در انتقال کلسترول به میتوکندری نقش دارند، تولید پروژسترون توسط سلول‌های لوتئال را مهار می‌کند (۲۶).به‌طورکلی، اگرچه گونه‌های فعال اکسیژن برای بلوغ تخمک ضروری هستند، اما مقادیر مازاد آن‌ها ممکن است در استرس اکسیداتیو و کیفیت پایین تخمک نقش داشته باشند.

روی نیز یکی از عناصر معدنی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است. این عنصر یک ریزمغذی است که به وفور در گوشت و غذاهای دریایی یافت می‌شود و به‌عنوان کوفاکتور در ساختار تعداد فراوانی از آنزیم‌های درگیر در رونویسی DNA و سنتز پروتئین عمل می‌کند (۲۷). از آنجا که رونویسی DNA بخش عمده‌ای از رشد سلول‌های زایا را برمی‌گیرد، احتمالاً این عنصر بر فرآیندهای تولیدمثلی نیز اثرگذار باشد. در این راستا، مطالعات نشان دادند که روی در بیان ژنتیکی گیرنده‌های هورمون استروئیدی نقش دارد (۲۸) و دارای خواص ضد آپوپتوز و آنتی اکسیدانی است (۲۹). روی می‌تواند با اتصال به گروه‌های سولفیدریل در پروتئین‌ها و با اشغال جایگاه‌های اتصال آهن و مس در لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA، با اکسیداسیون مقابله کند (۲۹). برای اثبات این اثرات آنتی‌اکسیدانی روی، شواهدی از آسیب اکسیداتیو پروتئین‌ها، لیپیدها و DNA در موش‌های سوری و صحرایی دارای کمبود روی یافت و نشان داده شد که نمک‌های روی از موش‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو و کاهش گلوتاتیون محافظت می‌کنند (۳۰).

با توجه به نقش کلیدی ملاتونین و روی در فرآیندهای تولیدمثلی، در مطالعه حاضر به بررسی اثرات تجویز جداگانه و توأمان ملاتونین و روی بر پارامترهای فولیکولی تخمدان پرداخته شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، در گروه دریافت‌کننده ترکیب روی و ملاتونین، میانگین قطر سلول‌های گرانولوزا نسبت به گروه‌های کنترل افزایش یافت ($P<0.05$). همچنین میانگین قطر فولیکول‌های بالغ و میانگین تعداد فولیکول‌های آنترال در موش‌های دریافت کننده ملاتونین نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی داری داشت ($P<0.05$). علاوه بر این، تجویز ملاتونین به تنهایی یا در ترکیب با روی سبب کاهش تعداد سلول‌های آپوپتیک در مقاسه با گروه‌های کنترل شد، اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. در امتداد مطالعات انجام‌شده روی خواص آنتی اکسیدانی ملاتونین در انسان، مشخص شد که تجویز این هورمون غلظت ملاتونین داخل فولیکولی را افزایش می‌دهد، از آسیب اکسیداتیو داخل فولیکولی کاسته و نرخ لقاح و بارداری را می‌افزاید (۳۱). همچنین در تائید این یافته‌ها، محققان نشان دادند که ملاتونین از سلول‌های گرانولوزا در برابر ROS در طول تخمک گذاری محافظت و به لوتئینیزاسیون آن‌ها کمک می

کند (۳۲). مشخص شده است که سطوح ملاتونین در مایع فولیکولی پیش از تخمک گذاری در انسان از غلظت سرمی آن بیشتر می‌باشد و سطح ملاتونین در فولیکول‌های تخمدان بسته به روند رشد فولیکولی افزایش می‌یابد (۳۳). آزمایش بر روی موش‌های صحرایی نشان داد که ملاتونین اثر محافظتی قابل‌توجهی بر فولیکول‌های بدوی داشته و بیان مولکولِ هدفِ راپامایسین در پستانداران (mTOR) را در تخمدان موش‌ها افزایش می‌دهد (۳۴).

اگرچه نقش روی در تنظیم عملکردهای تولیدمثلی به اثبات رسیده، با این حال سهم اندکی از تحقیقات به جنس ماده اختصاص یافته است. شاو و همکاران (۱۹۷۴) دریافتند که کمبود روی در خرگوش‌های ماده منجر به بی‌علاقگی به همتایان نر آن‌ها و عدم موفقیت در تخمک‌گذاری می‌شود. علاوه بر این، اندومتر این خرگوش‌ها رنگ پریده و غیرفعال بود و این خرگوش‌ها قادر به بارداری نبودند. با این حال، محققان نمی‌توانستند اثرات مشاهده‌شده مربوط به کمبود سایر مواد مغذی حیاتی را نیز رد کنند (۳۵). در مطالعه‌ای دیگر، کمبود روی منجر به چرخه‌های فحلی غیرطبیعی در موش‌های صحرایی ماده شد (۳۶). علاوه بر این، اثرات کمبود روی در دو گونه از میمون‌ها نیز بررسی و مشخص شد که تولیدمثل طبیعی هر دو گونه تحت این شرایط مختل گردیده است. میزان باروری در میمون‌های دارای کمبود روی در مقایسه با کلنی اصلی به دلیل توقف در چرخه‌های قاعدگی فصلی به‌طور قابل‌توجهی کمتر بود. با این حال، برخی از میمون‌هایِ دچار کمبود روی همچنان توانایی بارداری داشتند (۳۷). تمامی تحقیقات ذکر شده، هم‌راستا با مطالعه حاضر و حاکی از نقش بهبودبخش ملاتونین و روی در بازده تولیدمثل و نیز اثرات محافظت‌کننده آن‌ها بر بافت تخمدان و پارامترهای فولیکولی بودند.

علاوه بر بررسی پارامترهای فولیکولی تخمدان، در مطالعه حاضر تغییرات سطح هورمون استروژن متعاقب تجویز ملاتونین و روی (جداگانه و توأمان) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست‌آمده، اگرچه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها مشاهد نشد، اما با این حال سطح استروژن موش‌های دریافت‌کننده ملاتونین بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($P\geq0.05$). مشخص شده است که ملاتونین در فعالسازی گیرنده استروژن تداخل ایجاد نموده و اتصال کمپلکس گیرنده - استروژن را بی‌ثبات می‌کند (۳۸). اخیراً، گزارش شده است که موش‌های ماده تحت درمان با ملاتونین نه تنها کاهش سطح LH و استرادیول را نشان می‌دهند، بلکه افزایش قابل توجهی در سطح پروژسترون نیز دارند (۳۹). از سوی دیگر، مشخص شده است که ملاتونین با اثرگذاری از طریق چندین مسیر عملکرد سلول‌های سرتولی را تنظیم می‌کند و منجر به تولید اسپرم و همچنین ترشح استروژن و پروژسترون می شود (۳۶). در خصوص نقش روی در تنظیم هورمون‌های جنسی نیز، افزایش تعداد گیرنده‌های استروژن در موش‌های مبتلا به کمبود روی گزارش شده است (۳۷). باتوجه به محدودیت تحقیقات انجام شده و نیز ارائه نتایج بعضاً متناقض، اظهار نظر قطعی پیرامون نوع اثرگذاری ملاتونین و روی بر سطح هورمون استروژن مستلزم انجام مطالعات بیشتر در این زمینه است.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های بدست آمده، تجویز ملاتونین به‌تنهایی یا به‌همراه روی، پارامترهای فولیکولی تخمدان در موش‌های صحرایی ماده را بهبود می‌بخشد اما تأثیری بر سطح هورمون استروزن ندارد. بی‌شک انجام مطالعات اتی در این زمینه می‌تواند علاوه‌بر کاربرد در زمینه اصلاح نژاد و برنامه‌های پرورشی دام‌ها، نویدبخش شناسایی درمان‌های نوین برای ناباروری و سایر اختلالات تولیدمثلی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان، از همکاری مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج در به انجام رساندن این پژوهش تشکر و فدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله تعارضی در منافع ندارند.

منابع

1. Harlow HJ. Influence of the pineal gland and melatonin on blood flow and evaporative water loss during heat stress in rats. Journal of pineal research. 1987;4(2):147-59.
2. Bhattacharya K, Sengupta P, Dutta S. Role of melatonin in male reproduction. Asian Pacific Journal of Reproduction. 2019;8(5):211-9.
3. Unfer V, Raffone E, Rizzo P, Buffo S. Effect of a supplementation with myo-inositol plus melatonin on oocyte quality in women who failed to conceive in previous in vitro fertilization cycles for poor oocyte quality: a prospective, longitudinal, cohort study. Gynecological Endocrinology. 2011;27(11):857-61.
4. Lampiao F, Du Plessis SS. New developments of the effect of melatonin on reproduction. World Journal of Obstetrics and Gynecology. 2013;2(2):8-15.
5. Eryilmaz OG, Devran A, Sarikaya E, Aksakal FN, Mollamahmutoğlu L, Cicek N. Melatonin improves the oocyte and the embryo in IVF patients with sleep disturbances, but does not improve the sleeping problems. Journal of assisted reproduction and genetics. 2011;28:815-20.
6. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. Current neuropharmacology. 2017;15(3):434-43.
7. Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. Pharmacological reports. 2009;61(3):383-410.
8. Adah AS, Adah DA, Nwonuma CO, Oyekunle T, Olaosebikan B. Melatonin Modulates Haematological and Water Quality Parameters Following a 100 Km Transportation of Clarias gariepinus by Road. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 2023;17(3).
9. Maganhin CC, Fuchs LFP, Simões RS, Oliveira-Filho RM, de Jesus Simões M, Baracat EC, et al. Effects of melatonin on ovarian follicles. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2013;166(2):178-84.
10. Huang JYJ, Rosenwaks Z. Assisted reproductive techniques. Human fertility: methods and protocols. 2014:171-231.
11. Frassinetti S, Bronzetti GL, Caltavuturo L, Cini M, Della Croce C. The role of zinc in life: a review. Journal of environmental pathology, toxicology and oncology. 2006;25(3).
12. Jackson M, Lowe N. Physiological role of zinc. Food chemistry. 1992;43(3):233-8.
13. Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. Physiological reviews. 2015.
14. Maret W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. Advances in nutrition. 2013;4(1):82-91.
15. Vašková J, Klepcová Z, Špaková I, Urdzík P, Štofilová J, Bertková I, et al. The importance of natural antioxidants in female reproduction. Antioxidants. 2023;12(4):907.
16. Rahimi F, Zendehdel M, Rezaee M, Vazir B, Sh F. The Effects of Melatonin Alone or in Combination with Zinc on Gonadotropin and Thyroid Hormones in Female Rats. Archives of Razi Institute. 2023;78(6):1698.
17. Caufriez A, Leproult R, L'Hermite-Balériaux M, Kerkhofs M, Copinschi G. Progesterone prevents sleep disturbances and modulates GH, TSH, and melatonin secretion in postmenopausal women. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2011;96(4):E614-E23.
18. Hasanpur A, Afshari F, Issabeagloo E. The assesment of morphological changes of ovary and fallopian tube after aplication of Antiprogesterone and Esterogen in the hyperstimulated mice. Cell and Tissue Journal. 2022;13(1):45-55.
19. Christensen A, Bentley G, Cabrera R, Ortega HH, Perfito N, Wu T, et al. Hormonal regulation of female reproduction. Hormone and metabolic research. 2012;44(08):587-91.

20. Waldhauser F, Weiszenbacher G, Tatzer E, Gisinger B, Waldhauser M, Schemper M, et al. Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1988;66(3):648-52.
21. Coto-Montes A, Boga JA, Rosales-Corral S, Fuentes-Broto L, Tan D-X, Reiter RJ. Role of melatonin in the regulation of autophagy and mitophagy: a review. Molecular and cellular endocrinology. 2012;361(1-2):12-23.
22. Reiter R, Paredes S, Korkmaz A, Manchester L, Tan D. Melatonin in relation to the" strong" and" weak" versions of the free radical theory of aging. Advances in medical sciences. 2008;53(2):119.
23. Sánchez-Barceló E, Mediavilla M, Tan D, Reiter R. Clinical uses of melatonin: evaluation of human trials. Current medicinal chemistry. 2010;17(19):2070-95.
24. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reproductive biology and endocrinology. 2005;3:1-21.
25. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. Journal of the Society for Gynecologic Investigation. 2001;8(1_suppl):S40-S2.
26. BEHRMAN HR, ATEN RF. Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. Endocrinology. 1991;128(6):2958-66.
27. Coleman JE. Zinc enzymes. Current opinion in chemical biology. 1998;2(2):222-34.
28. Favier AE. The role of zinc in reproduction: hormonal mechanisms. Biological trace element research. 1992;32:363-82.
29. Zago MP, Oteiza PI. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 2001;31(2):266-74.
30. Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Tran MX, Krohn RL, Ray SD, et al. Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathione depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice. General Pharmacology: The Vascular System. 1998;30(1):43-50.
31. Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, et al. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. Journal of ovarian research. 2012;5:1-9.
32. Taketani T, Tamura H, Takasaki A, Lee L, Kizuka F, Tamura I, et al. Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. Journal of Pineal Research. 2011;51(2):207-13.
33. Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan D-X, Sugino N, et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. Fertility and sterility. 2009;92(1):328-43.
34. Kandemir YB, Aydin C, Gorgisen G. The effects of melatonin on oxidative stress and prevention of primordial follicle loss via activation of mTOR pathway in the rat ovary. Cellular and molecular biology. 2017;63(2):100-6.
35. Shaw NA, Dickey H, Brugman H, Blamberg D, Witter J. Zinc deficiency in female rabbits. Laboratory animals. 1974;8(1):1-7.
36. Swenerton H, Hurley LS. Severe zinc deficiency in male and female rats. The Journal of nutrition. 1968;95(1):8-18.
37. Swenerton H, Hurley LS. Zinc deficiency in rhesus and bonnet monkeys, including effects on reproduction. The Journal of Nutrition. 1980;110(3):575-83.
38. Rato AG, Pedrero JG, Martínez MA, Del Rio B, Lazo PS, Ramos S. Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding. The FASEB journal. 1999;13(8):857-68.
39. Chuffa LGA, Seiva FR, Fávaro WJ, Amorim JPA, Teixeira GR, Mendes LO, et al. Melatonin and ethanol intake exert opposite effects on circulating estradiol and progesterone and differentially regulate sex steroid receptors in the ovaries, oviducts, and uteri of adult rats. Reproductive Toxicology. 2013;39:40-9.

Effects of zinc and melatonin on estrogen hormone levels and ovarian follicular parameters in female rats

Fariba Rahimi[1], **Morteza Zendehdel**[2], Mohammad Jaafar Rezaei[3], Bita Vazir[4], Shahin Fakour[5]

1-Phd, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2-Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Corresponding author: zendedel@ut.ac.ir

3- Associate Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Kurdistan university of Medical Science, Sanandaj, Iran.

4-Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5-Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Abstract

Background & Aim: The importance of the reproduction process in the continuation of the human race and the increase in livestock production has prompted researchers to conduct extensive research with the aim of identifying the factors and compounds affecting reproductive efficiency. In this regard, in the current study, we investigate the effects of melatonin and zinc administration separately or together on estrogen hormone levels and ovarian follicular parameters in female rats.

Materials and methods: A total of 35 adult female rats were distributed in a completely randomized design with 5 treatments, 7 repetitions and placing two mice in each cage and were treated by gavage in the opposite order for 20 days: control group-1: Base diet, control group-2: normal saline, treatment group-1: zinc (40 ppm), treatment group-2: melatonin (5 mg/kg) and treatment group-3: melatonin + zinc. After performing these steps, serum and ovarian tissue sections of the samples were evaluated in terms of hormonal and histopathological changes.

Results: Based on the findings, in the melatonin + zinc group, the average diameter of granulosa cells increased significantly compared to the control groups ($P<0.05$). Also, the average diameter of mature follicles and the average number of antral follicles in rats receiving melatonin increased significantly compared to the control groups ($P<0.05$). However, the administration of zinc and melatonin alone or separately did not have a significant effect on estrogen hormone levels ($P\geq0.05$).

Conclusion: The results obtained from this study showed that administration of melatonin alone or in combination with zinc improves ovarian follicular parameters in female rats, but has no effect on estrogen hormone levels.

Key words: Estrogen, Female rat, Melatonin, Zinc