

Original Article

Evaluation of Ethephon on *in vitro* Fertilization and Oxidative Stress in Female mice

Raheleh Bagheri Balkanloo¹ , Shiva Khezri^{1*} , Gholamreza Najafi² 

¹Department of Biology,
School of Sciences, Urmia
University, Urmia, Iran.

²Department of Basic
Science, School of Veterinary
Medicine, Urmia University,
Urmia, Iran.

*Corresponding Author:
Shiva Khezri; Department
of Biology, School of Basic
Science, Urmia University,
Urmia, Iran.

Email:
sh.khezri@urmia.ac.ir ,
skhezri72@gmail.com

Received: 19 Jan, 2020
Accepted: 30 May, 2020

Abstract

Background and Objectives: Ethephon is an effective plant growth regulator, which improves product quality and can probably interfere with the function of the reproductive system. The aim of this study was to investigate the effect of ethephon on *in vitro* fertility and oxidative stress in mice.

Methods: In this experimental study, the animals were divided into 5 groups; control (received no substances), sham (daily received serum physiology orally), ethephon 1 (daily received 192 mg/kg orally), ethephon 2 (daily received 240 mg/kg orally), ethephon 3 (daily received 480 mg/kg orally). At the end of the 28-day treatment period, the ovaries were removed from their body for *in vitro* fertilization. Oxidative stress markers, including malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (TAC), were measured in serum samples. Fertility parameters, including oocyte percentage, fertilization percentage, and embryo quality, were also examined. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results: The results of the experiments showed that total antioxidant capacity was significantly decreased in the groups treated with ethephon as compared to the control group. TAC compared to the control group ($p < 0.05$) and the level of MDA in ethephon-treated mice increased compared to the control mice ($p < 0.05$). In addition, fertilization rate, percentage of two-cell embryos, and blastocysts decreased in all three groups receiving ethephon. This difference was significant in high, medium, and low dose groups compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: It can be concluded that oral administration of ethephon with effectivity on the oxidative stress system can cause deleterious effect on fertility and embryo development process in mice.

Keywords: Ethephon; Oxidative stress; *In vitro* fertilization; Mice.

DOI: 10.29252/qums.14.2.24

اثرات اتفون بر توان باروری آزمایشگاهی و استرس اکسیداتیو در موش سوری ماده

راحله باقری بالکانلو^۱، شیوا خضری^{۲*}، غلامرضا نجفی^۲

چکیده

زمینه و هدف: اتفون کنترل کننده مؤثر رشد گیاهی است که کیفیت محصول را بهبود می بخشد و احتمالاً باعث اختلال در عملکرد سیستم تولیدمثل می شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر اتفون بر استرس اکسیداتیو و توان باروری آزمایشگاهی در موش سفید کوچک آزمایشگاهی است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، حیوانات به ۵ گروه تقسیم شدند؛ گروه کنترل (بدون دریافت هرگونه ماده)، شم (دریافت روزانه سرم فیزیولوژی به صورت خوراکی)، اتفون ۱ (دریافت روزانه ۱۹۲ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی)، اتفون ۲ (دریافت روزانه ۲۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی)، اتفون ۳ (دریافت روزانه ۴۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی). در پایان دوره درمان ۲۸ روزه، تخمدانها برای انجام لقاح داخل آزمایشگاهی از بدن خارج شدند. نشانگرهای استرس اکسیداتیو شامل مالون دی آلدئید (MDA) و ظرفیت آنتی اکسیدان کل (TAC) در نمونه های سرم خونی اندازه گیری شد. همچنین پارامترهای باروری شامل درصد اووسیت، درصد لقاح و کیفیت جنین ها بررسی شدند. داده ها با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه و پس آزمون توکی تحلیل شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام در گروه های تیمار شده با اتفون نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$) و میزان مالون دی آلدئید خونی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری یافت ($P < 0.05$). همچنین درصد لقاح، درصد جنین های دوسلولی و بلاستوسیت ها در هر سه گروه دریافت کننده اتفون کاهش یافت. این کاهش در دُز زیاد، متوسط و کم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: می توان نتیجه گرفت که تجویز خوراکی اتفون احتمالاً با اثرگذاری بر سیستم استرس اکسیداتیو باعث ایجاد اثرات سوئی بر توان باروری و روند رشد جنین ها در موش سوری می شود.

کلیدواژه ها: اتفون، استرس اکسیداتیو، باروری آزمایشگاهی، موش سوری.

^۱گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

شیوا خضری؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

skhezri72@gmail.com;
sh.khezri@urmia.ac.ir

تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Bagheri Balkanloo R, Khezri Sh, Najafi Gh. Evaluation of Ethephon on in vitro Fertilization and Oxidative Stress in Female mice. Qom Univ Med Sci J 2020;14(2):24-33. [Full Text in Persian]

اگر آسیب به سلول بیش از حد باشد، بدن از سازوکارهای دیگری برای مراقبت از آسیب‌های اکسیداتیو استفاده می‌کند که شامل پاسخ‌های استرسی پیچیده مانند خودکشی برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) است (۱۵).

نتایج مطالعات نشان می‌دهد گونه‌های فعال اکسیژن در علل ناباروری دخیل هستند و سطح بیش از حد آن می‌تواند یکی از علل اصلی عملکرد ناقص اسپرم باشد که نه تنها باعث نقص در سلامت DNA اسپرم می‌شود، بلکه به دلیل اکسیدشدن پروتئین‌ها و مخصوصاً اسیدهای چرب غشاء، لقاح را تحت تأثیر قرار می‌دهد. افزایش سطح استرس اکسیداتیو در اسپرم علاوه بر اینکه سرعت آسیب DNA اسپرم را تسهیل می‌کند، می‌تواند به فعال شدن مسیرهای آپوپتوز و مرگ سلول منجر شود؛ بنابراین، کیفیت مایع منی از لحاظ عملکردی کاهش می‌یابد (۱۶). اصلی‌ترین گونه‌های فعال اکسیژن در تخمدان پستانداران شامل رادیکال آنیون سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است (۱۷).

با توجه به اثرات مخرب اتفون بر اعضای بدن، هدف از این آزمایش بررسی اثر اتفون بر توان باروری آزمایشگاهی و سیستم استرس اکسیداتیو از جمله MDA و TAC در خون موش سفید ماده است.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی، از ۲۵ موش ماده‌ی بالغ نژاد (NMRI) با وزن تقریبی ۳۰ گرم با سن ۸ هفته استفاده شد. حیوانات قبل از شروع مطالعه به مدت یک هفته به شرایط محیطی عادت داده شدند و داخل قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی 50 ± 10 درصد و تحت چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی حاوی پلت، گندم و ذرت نگهداری شدند. روند این مطالعه بر اساس دستورالعمل‌های مصوب کمیته‌ی اخلاق دانشگاه ارومیه با کد اخلاق ۳۷۴/IR-UU-AEC-74 انجام و تمام موارد اخلاقی مربوط به کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. حیوانات مطالعه‌شده به ۵ گروه و در هر گروه ۵ موش ماده‌ی سوری به شرح ذیل تقسیم شدند:

با توجه به افزایش روزافزون جمعیت، نیاز به تولیدات کشاورزی و مواد غذایی افزایش یافته است. در بیشتر کشورهای جهان، بخصوص در کشورهای در حال توسعه، مواد تنظیم‌کننده‌ی رشد گیاهی مثل انواع هورمون‌ها نقش مهمی در حفاظت و تکثیر محصولات بر عهده دارند (۱).

رده‌های جدید آفت‌کش‌ها و هورمون‌ها روی سیستم تولیدمثلی ماده اثرات سمی دارند که شامل تغییر در رفتار جنسی، بلوغ، باروری، زمان باروری و تولید شیر است که به سیستم تولیدمثلی ماده آسیب می‌زند (۲). مطالعات مختلف نشان می‌دهند عوامل مختلفی مانند سطح بالای فعالیت فیزیکی، سن، استرس، مصرف سیگار و همچنین در معرض قرارگیری آفت‌کش‌ها، چرخه‌ی تخمدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به نظر می‌رسد این سموم با اختلال در عملکرد هورمونی زنان و چرخه‌ی تخمدانی اثراتی منفی بر فرایند باروری دارند (۳، ۴). از هورمون‌های غیرمجاز در محصولات کشاورزی، اتفون با نام علمی ۲-کلرو اتیل فسفونیک اسید است که برای تسریع در رسیدن و بهبود کیفیت میوه به کار می‌رود. مهم‌ترین عوارض آفت‌کش‌ها و از جمله اتفون در بدن عبارت‌اند از: سرطان، سوزش و خارش پوست، اسهال، بیماری کبدی، بیماری کلیوی، التهاب معده و روده، بیماری‌های تنفسی، اختلالات قلبی و تضعیف سیستم عصبی مرکزی (۵-۷). اتفون به عنوان مهارکننده‌ی آنزیم استیل کولین استراز (Acetylcholinesterase) به‌ویژه در پلاسمای برخی از حیوانات مثل رت، موش سفید کوچک آزمایشگاهی، سگ و انسان در شرایط آزمایشگاهی مطرح است (۸، ۹). نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد قرارگرفتن در معرض اتفون به اثرات مخرب بر سیستم تولیدمثلی مانند تولد نوزاد نارس، کاهش باروری در زنان و مردان و همچنین اختلال در عملکرد غدد درون‌ریز منجر می‌شود (۱۰-۱۱).

اتفون با دُز کم هیچ‌گونه تغییرات دژنراتیو و موتاژنیک ایجاد نمی‌کند، برعکس با دُز بیشتر اثرات موتاژنیک، تراوتاژنیک، تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و همچنین آسیب به DNA را ایجاد می‌کند (۱۵-۱۲).

گروه کنترل: هیچ ماده‌ای دریافت نکردند.

گروه شم (sham): حیوانات این گروه ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم نرمال سالین به صورت خوراکی و از طریق دستگاه گاوژ دریافت کردند.

گروه اتفون دُز کم (اتفون ۱): حیوانات این گروه اتفون را با دُز روزانه ۱۹۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی دریافت کردند.

گروه اتفون با دُز متوسط (اتفون ۲): حیوانات این گروه روزانه ۲۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اتفون را به صورت خوراکی دریافت کردند.

گروه اتفون با دُز زیاد (اتفون ۳): حیوانات این گروه روزانه ۴۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اتفون را به صورت خوراکی دریافت کردند (۱۵).

در پایان دوره‌ی تیمار ۲۸ روزه، تمام حیوانات موجود در پنج گروه ذکرشده، ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار با استفاده از کتامین ۵ درصد با دُز ۰/۸۵ سی‌سی و ۰/۱۵ سی‌سی زایلازین به روش داخل صفاقی بیهوش شدند. سپس با استفاده از جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند و نمونه‌های خون با سرنگ‌های استریل حاوی هپارین از قلب حیوانات جمع‌آوری شد. به منظور به‌دست‌آوردن سرم، نمونه‌ها در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم خونی (TAC)

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سرم خونی با استفاده از کیت TAC شرکت Zellbio آلمان

(Zellbio GmbH, Deutschland) انجام گرفت. مطابق با پروتکل اجرایی این شرکت، رقت‌های سریالی محلول استاندارد تهیه و برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. با استفاده از این منحنی و معادله‌ی مربوط به آن، میزان TAC نمونه‌ی سرم خونی محاسبه شد. هر نمونه دو مرتبه تهیه و در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) سرم خونی

اندازه‌گیری MDA با استفاده از کیت شرکت Zellbio آلمان (Zellbio GmbH, Deutschland) انجام گرفت.

مطابق با پروتکل اجرایی این شرکت، رقت‌های سریالی محلول استاندارد تهیه و برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. با استفاده از این منحنی و معادله‌ی مربوط به آن، میزان MDA نمونه‌ی سرم خونی محاسبه شد. هر نمونه دو مرتبه تهیه و در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد.

گرفتن اووسیت از اویداکت

برای به‌دست آوردن اووسیت به منظور بررسی درصد لقاح و کیفیت رویان‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی به تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های ماده نیاز است. ابتدا به موش‌های سوری ماده بالغ ۱۰ واحد بین‌المللی هورمون گنادوتروپین مادین آبستن (Pregnant mares Serum Gonadotropin) PMSG به صورت داخل صفاقی تزریق شد. پس از ۴۸ ساعت، هورمون گنادوتروپین جفت انسان hCG (Human Tubular Fluid) به میزان ۱۰ واحد بین‌المللی به صورت داخل صفاقی تزریق شد (۱۸). ۱۰ تا ۱۲ ساعت بعد از تزریق hCG موش‌ها پس از بیهوشی با کتامین-زایلازین، آسان‌کشی شدند. بعد از بازکردن محوطه‌ی شکمی، اویداکت‌ها از موش جدا و داخل محیط کشت HTF قرار داده شد. سپس با استفاده از روش شکافتن با سرنگ انسولین گیج ۲۸ از ناحیه‌ی آمپول در زیر استریو میکروسکوپ اووسیت‌ها به همراه توده‌ی کومولوسی COCs گرفته شدند. تخمک‌ها پس از شست‌وشو داخل قطرات محیط کشت لقاح (HTF حاوی BSA) در زیر روغن معدنی (Mineral oil) گذاشته شدند (۱۹).

اسپرم‌های جداشده مربوط به تمامی گروه‌ها پس از طی روند ظرفیت‌یابی به‌طور مجزا به تعداد یک میلیون به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شدند. عمل لقاح حدود ۴ تا ۶ ساعت بعد از اضافه‌کردن اسپرم صورت گرفت. پس از این مدت، تعداد زیگوت‌های تشکیل‌شده در هر گروه بررسی و به صورت درصد لقاح در هر گروه بیان شد. برای ارزیابی میزان باروری آزمایشگاهی و روند رشد رویان، بعد از لقاح مراحل رشد رویانی در زیر میکروسکوپ اینورت ارزیابی شد. بررسی میزان شکافتگی یا رویان‌های دوسلولی ۲۴ ساعت بعد از کشت صورت گرفت و رویان‌های موجود در هر گروه از نظر میزان فراگمانتاسیون و میزان طی مراحل رشد رویانی با توجه به عوامل مختلفی نظیر لیز شدن و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمی مقایسه شد.

شم دارد ($P < 0.05$)، به طوری که در گروه‌های دریافت‌کننده ی اتفون این افزایش در میزان MDA سرمی به دُز وابسته بود. به این صورت که با افزایش دُز اتفون میزان افزایش MDA بیشتر شده است. همچنین بین هر سه گروه دریافت‌کننده ی اتفون با دُزهای کم و متوسط و زیاد اختلاف معنی‌داری در میزان MDA سرمی دیده می‌شود ($P < 0.05$) (نمودار ۲).

نتایج مربوط به لقاح آزمایشگاهی (IVF)

تعداد اووسیت

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد تعداد اووسیت‌ها در هر سه گروه اتفون با دُز کم، متوسط و زیاد به دُز وابسته بود و با افزایش دُز، کاهش یافته است. این کاهش در هر سه دُز اتفون اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل و شم نشان می‌دهد ($P < 0.05$). همچنین بین گروه اتفون دُز کم و زیاد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول ۱).

درصد جنین‌های دوسلولی

درصد جنین‌های دوسلولی در هر سه گروه اتفون با دُز کم، متوسط و زیاد در مقایسه با گروه کنترل و شم کاهش یافته است و اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). همچنین بین گروه‌های دریافت‌کننده ی اتفون دُز کم و متوسط با دُز زیاد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول ۱).

درصد لقاح

درصد لقاح در هر سه گروه اتفون با دُز کم، متوسط و زیاد به دُز وابسته بود و با افزایش دُز، کاهش یافته است. این کاهش در هر سه دُز اتفون اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل و شم نشان می‌دهد ($P < 0.05$). همچنین در کاهش درصد لقاح بین گروه‌های دریافت‌کننده ی اتفون دُز زیاد و متوسط با دُز کم اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) (جدول ۱).

درصد جنین‌های هچ‌شده

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد درصد جنین‌های هچ‌شده در هر سه دُز اتفون کاهش یافته است و اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و شم دارد ($P < 0.05$) (جدول ۱).

درصد جنین‌های مرحله ی بلاستوسیست

تزریق اتفون باعث کاهش درصد جنین‌های مرحله ی بلاستوسیست شد، به طوری که در هر سه دُز اختلاف معنی‌داری در

کیفیت رویان‌ها و تعداد رویان‌های رشد کرده، درصد شکافتگی رویان‌های دوسلولی و درصد بلاستوسیست‌های ایجاد شده در هر گروه ارزیابی شد.

گرفتن اسپرم از موش نر

پس از اینکه دم اپیدیدیم‌ها با رعایت اصول استریل برداشته و بافت‌های همبندی اطراف جدا شد، دم اپیدیدیم برای خروج اسپرم‌ها به قطعات کوچک بریده شد. سپس در لوله ی فالكون‌های استریل حاوی یک میلی‌لیتر محیط کشت HTF و ۴ میلی‌گرم آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin) قرار داده شد. به منظور خارج شدن اسپرم‌ها از اپیدیدیم، دم اپیدیدیم‌ها به قطعات کوچک‌تر بریده شد و لوله ی فالكون‌ها در انکوباتور CO_2 ۵ درصد با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت تا اسپرم‌ها آزاد و وارد محیط کشت شوند.

تحلیل‌های آماری

داده‌های حاصل از مطالعات به روش آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ ارزیابی شد. مقدار $P < 0.05$ برای تعیین سطح معنی‌داری بین گروه‌ها در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد.

یافته‌ها

ارزیابی تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC) در سرم خونی

تحلیل داده‌های مربوط به میزان TAC سرم نشان داد در گروه‌های دریافت‌کننده ی اتفون، میزان TAC سرمی کاهش یافت که این کاهش در هر سه دُز اتفون اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و شم داشت ($P < 0.05$). همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان کاهش غلظت سرمی TAC در گروه اتفون با دُز کم در مقایسه با گروه اتفون با دُز زیاد مشاهده شد ($P < 0.05$) (نمودار ۱).

تغییرات غلظت مالون دی آلدئید (MDA) سرم خونی

تحلیل داده‌های مربوط به مالون دی آلدئید سرم نشان داد میزان MDA سرمی در گروه‌های دریافت‌کننده ی اتفون با دُزهای کم، متوسط و زیاد اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل و

مقایسه با گروه کنترل نشان دیده شد؛ اما هیچ اختلاف معنی داری ما بین سه دُز اتفون دیده نشد (جدول ۱).

درصد جنین‌های متوقف‌شده

نتایج نشان داد درصد جنین‌های متوقف‌شده در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده اتفون افزایش یافته است. این افزایش در هر سه گروه با گروه کنترل و شم اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

همچنین اختلاف معنی داری بین گروه‌های دریافت‌کننده اتفون با دُز کم و گروه دُز زیاد دیده شد ($P < 0.05$) (جدول ۱).

در شکل ۱ آمپول اویداکت دیسکت شده (1)، تعدادی اووسیت حاوی توده کومولوسی (2) (A)، اووسیت‌های حاوی توده کومولوسی داخل قطره‌ی لقاح (B)، اووسیت بارور شده (C)، جنین دوسلولی (D)، جنین چهارسلولی (E)، مورولا (F)، بلاستوسیست اولیه (G) و جنین در حال هچ شدن (H) مشاهده می‌شود.



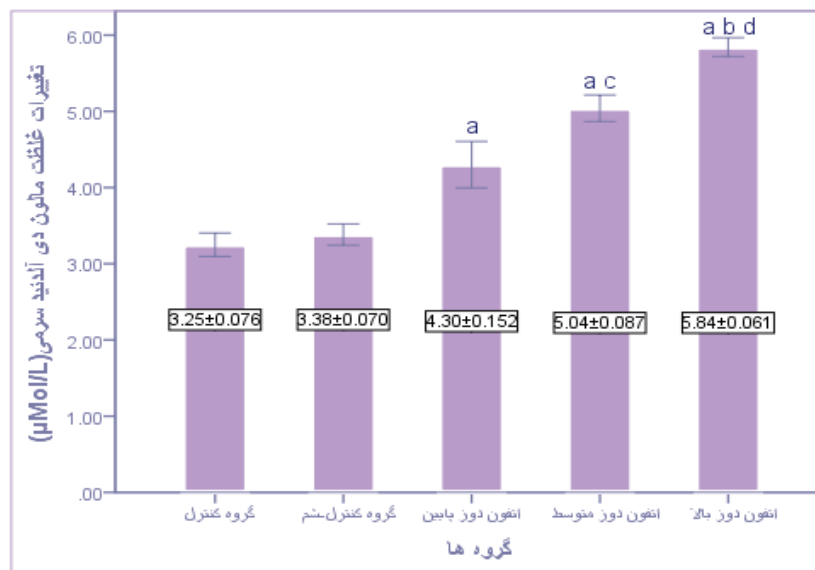
نمودار شماره ۱: مقایسه‌ی میزان TAC سرمی در گروه‌های مختلف آزمایشی

a: وجود اختلاف معنی دار در گروه‌های اتفون دُز زیاد، متوسط و کم با گروه کنترل ($P < 0.05$)

b: وجود اختلاف معنی دار در گروه اتفون دُز کم با اتفون دُز زیاد ($P < 0.05$)

جدول شماره ۱: مقایسه‌ی عوامل باروری در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه	تعداد اووسیت	درصد جنین‌های دوسلولی	درصد لقاح	درصد جنین‌های هچ شده	درصد بلاستوسیست	درصد جنین‌های متوقف شده
کنترل	45/0±1/0	89/7±1/4	82/0±0/2/9	51/4±4/4	68/5±3/6	18/0±1/9
شم	41/5±1/5	83/5±2/5	81/1±0/6/9	45/2±1/9	64/7±2/9	24/2±4/2
اتفون دُز کم	30/5±1/5	70/0±8/5	60/5±1/9	25/8±2/7	44/9±0/5	27/9±2/1
	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
اتفون دُز متوسط	27/0±1/0	67/7±2/7	51/4±1/4	24/7±2/5	44/2±5/7	36/2±5/4
	(a)	(a)	(a c)	(a)	(a)	(a c)
اتفون دُز زیاد	19/5±2/5	59/5±4/0	50/0±0/0	24/7±4/7	43/0±1/9	36/9±0/5
	(a b)	(a b d)	(a b)	(a)	(a)	(a b)



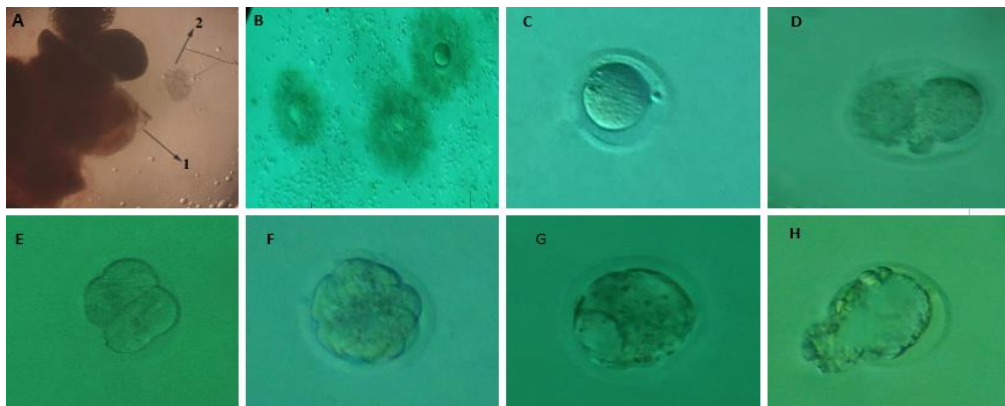
نمودار شماره ۲: مقایسه‌ی میزان MDA سرمی در گروه‌های مختلف آزمایشی

a: وجود اختلاف معنی‌دار در گروه‌های اتفون دُز زیاد، متوسط و کم با گروه کنترل ($P < 0.05$)

b: وجود اختلاف معنی‌دار در گروه اتفون دُز کم با اتفون دُز زیاد ($P < 0.05$)

c: وجود اختلاف معنی‌دار در گروه اتفون دُز کم با اتفون دُز متوسط ($P < 0.05$)

d: وجود اختلاف معنی‌دار در گروه اتفون دُز متوسط با اتفون دُز زیاد ($P < 0.05$)



شکل شماره ۱: A- آمپول اویداکت دیسکت شده (1)، تعدادی اووسیت حاوی توده کومولوسی (2)؛ B- اووسیت‌های حاوی توده‌ی کومولوسی داخل قطره‌ی لقاح؛

C- اووسیت بارور شده؛ D- جنین دوسلولی؛ E- جنین چهارسلولی؛

F- مامه‌ها؛ G- بلاسته سست اه له؛ H- جنین در حال هم‌شدن (۲۰۰×)

بحث

می‌تواند باعث ایجاد اثرات سوئی بر توان باروری و روند رشد

جنین‌ها در موش سفید کوچک آزمایشگاهی شود.

نتایج این پژوهش نشان داد میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه‌های تیمار شده با اتفون نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل‌توجهی کاهش پیدا کرد و میزان مالون دی آلدئید خونی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت. همچنین درصد لقاح، درصد جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیست‌ها در هر سه گروه دریافت‌کننده‌ی اتفون کاهش یافت و این کاهش در دُز

اتفون از جمله مواد شیمیایی استفاده‌شده در محصولات کشاورزی است که برای تسریع در رسیدن، تنظیم رشد و بهبود کیفیت محصول به کار می‌رود. هدف این تحقیق بررسی اثر اتفون بر توان باروری آزمایشگاهی (IVF) و استرس اکسیداتیو در موش ماده‌ی سفید کوچک آزمایشگاهی است. مطابق با نتایج به‌دست‌آمده طی انجام آزمایش می‌توان این‌گونه استنباط کرد که تجویز خوراکی اتفون با اثرگذاری بر سیستم استرس اکسیداتیو

زیاد، متوسط و کم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

در مطالعات مختلف مشخص شده است اتفون با اختلال در تعادل سیستم اکسیداسیون و آنتی‌اکسیداسیون باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در موش می‌شود؛ برای مثال، در مطالعه‌ای که در رابطه با اثر اتفون در ایجاد استرس اکسیداتیو در موش‌ها صورت گرفت، مشخص شد این ماده فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD) و گلووتاتیون پراکسیداز (GSH-Px) را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. در مطالعه‌ای دیگر مشخص شد تجویز اتفون به موش باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در طحال و تیموس شده است که همراه با افزایش غلظت MDA، کاهش سطح گلووتاتیون و مهار فعالیت کاتالاز بود. این در حالی بود که فعالیت SOD تغییر معناداری نداشت (۲۱-۲۰). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز همسو با یافته‌های اشاره‌شده، نشان داد اتفون میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در سرم موش کاهش و میزان مالون دی‌آلدئید را افزایش می‌دهد.

این موضوع به‌خوبی اثبات شده است که رادیکال‌های آزاد به‌طور پیوسته در متابولیسم سلولی تولید می‌شوند. این رادیکال‌های آزاد در طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها دخالت دارند. گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن آغازکننده‌های اصلی آسیب بافتی هستند و می‌توانند باعث اختلال در تنظیم فعالیت آنزیمی، رونویسی و بیان ژن شوند. اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد با سیستم آنتی‌اکسیدان درون‌سلولی مانند گلووتاتیون، اسیدآسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز کنترل و یا مهار می‌شود. سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی با یکدیگر به‌طور سینرژیک عمل می‌کنند تا تعادل مناسبی از مواد اکسیدانت-آنتی‌اکسیدانت را ایجاد کنند. در بدن شخص سالم گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و آنتی‌اکسیدان‌ها در تعادل هستند. هنگامی که برای افزایش گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن این تعادل از بین برود، استرس اکسیداتیو به وجود می‌آید. تغییرات اکسیداتیوی اجزای سلول در طی اثر رادیکال‌های آزاد اکسیژن یکی از فرایندهای آسیب‌رسان بالقوه بسیار مخرب در عملکرد سلول است که ممکن است به مرگ سلول از طریق نکروز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده منجر شود (۲۳-۲۲).

نتایج حاصل از این مطالعه نیز با مطالعات قبلی هم‌راستا بود، به‌طوری‌که در گروه‌های دریافت‌کننده اتفون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (TAC) در سرم خونی در گروه‌های دریافت‌کننده اتفون کاهش یافت که این کاهش در هر سه دُز اتفون اختلاف معنی‌داری را نسبت گروه کنترل و شم داشت.

در مطالعه‌ی ما نیز مشخص شد در گروه‌های دریافت‌کننده اتفون تغییرات MDA در سرم خونی مشاهده می‌شود، به‌طوری‌که میزان MDA سرمی در گروه‌های دریافت‌کننده اتفون با دُز کم، متوسط و زیاد افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل و شم دارند.

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، یکی از مکانیسم‌های سمیت اتفون، ایجاد استرس اکسیداتیو است. گونه‌های اکسیژن فعال در طیف وسیعی از عملکردهای فیزیولوژیکی باروری از قبیل بلوغ تخمک، استروئیدوژنز تخمدان، تخمک‌گذاری، لانه‌گزینی، تشکیل بلاستوسیست و عملکرد جسم زرد شرکت دارند. انواع رادیکال‌های آزاد اکسیژن (آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل) و مشتقات غیررادیکالی از اکسیژن (پراکسید هیدروژن) به‌شدت ناپایدارند و به‌طور سریع و غیراختصاصی با مولکول‌های زیستی واکنش نشان می‌دهند و به ایجاد و توسعه‌ی انواع آسیب‌های سلولی از جمله پراکسیداسیون غشای پلاسمایی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و نوکلئیک، آپوپتوزیس و نکروز منجر می‌شوند که درنهایت به کاهش قدرت زیست‌پذیری و تکوین جنین‌های آزمایشگاهی منجر می‌شود. اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد توسط سیستم آنتی‌اکسیدان درون‌سلولی مانند گلووتاتیون، اسیدآسکوربیک و آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلووتاتیون پراکسیداز کنترل یا مهار می‌شود (۲۴). باوجوداین، به‌نظر می‌رسد در شرایط رشد آزمایشگاهی جنین‌های پستانداران، میزان تولید این رادیکال‌های آزاد بیش از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جنین‌هاست. رادیکال‌های آزاد اکسیژن در محیط کشت می‌توانند رشد جنینی، میزان آبستنی کلینیکی و سطح باروری را تحت تأثیر قرار دهند. این نظریه وجود دارد که با غلظت زیاد رادیکال‌های آزاد در سیستم کشت آزمایشگاهی، تعداد جنین‌های با کیفیت رشد خوب کم خواهد بود.

در مطالعه‌ی حاضر نیز تعداد اووسیت، درصد لقاح، درصد جنین‌های دوسلولی، بلاستوسیست‌ها و جنین‌های هچ‌شده در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی اتفون در هر سه دُز کاهش یافته است و در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد. همچنین افزایش درصد جنین‌های متوقف‌شده با کیفیت پایین در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی اتفون به‌خصوص در دُز متوسط و زیاد مشاهده می‌شود.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت که تجویز اتفون خوراکی با اثرگذاری بر سیستم استرس اکسیداتیو احتمالاً می‌تواند باعث ایجاد اثرات سوئی بر توان باروری و روند رشد جنین‌ها در موش سفید کوچک آزمایشگاهی شود؛ بنابراین، توصیه‌ی کاربردی این تحقیق، جلوگیری از مصرف سم اتفون است.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بوده و با کمک معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام شده است. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه کمال تشکر را داریم.

درحالی‌که نتایج تحقیقات دیگر حاکی از آن است که کاهش سطح رادیکال‌های آزاد در شرایط محیط کشت موجب بهبود کیفیت جنین در مرحله بلاستوسیست می‌شود. علاوه‌براین، ارتباط مستقیم بین غلظت زیاد رادیکال‌های آزاد و افزایش میزان مرگ جنین‌های موش نشان داده شده است (۲۶-۲۵). در این مطالعه که با یافته‌های قبلی هم‌راستا است، نشان داده شد که اتفون باعث کاهش درصد اووسیت، لقاح و کیفیت جنین‌ها می‌شود. یکی دیگر از مکانیسم‌های سمیت اتفون مهار آنزیم بوتیریل کولین استراز (BuChE یا butyrylcholinesterase) است. گزارش‌ها نشان داده‌اند بین فعالیت آنزیم BuChE با دستگاه تولیدمثل در زنان رابطه‌ی تنگاتنگی وجود دارد. افزایش فعالیت BuChE در دوران حاملگی طبیعی باعث سم‌زدایی بهتر مواد توکسیک شده است. همچنین ممکن است الگوی تغییرات فعالیت آنزیم BuChE در فازهای چرخه‌ی قاعدگی به‌عنوان مارکری برای نشان‌دادن یک چرخه‌ی منظم و طبیعی سیکل قاعدگی در زنان استفاده شود (۲۸-۲۷).

References:

1. Aghilinejad M, Farshad AA, Naghavi M, Haghani HR. Assessment of the relationship between pesticide and their effects on farmer health in various state. Iran Occup Health J 2006;3(1):81-5. Link
2. Mnif W, Hassine AI, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. Int J Environ Res Public Health 2011;8(6):2265-303. PMID: 21776230
3. Mokhtar HI, Abdel-Latif HA, ElMazoudy RH, Abdelwahab WM, Saad MI. Effect of methomyl on fertility, embryotoxicity and physiological parameters in female rats. J Appl Pharm Sci 2013;3(12):19. Link
4. Kaboli Kafshgiri S, Parivar K, Baharara J, Hayati Roodbari N, Kerachian MA. Comparison the effect of movento, a chemical pesticide, with chitosan, a biologic pesticide, on female reproductive system in Balb/C mice. Nova Biol Rep 2017;3(4):279-87. Link
5. Bretveld RW, Thomas CM, Scheepers PT, Zielhuis GA, Roeleveld N. Pesticide exposure: the hormonal function of the female reproductive system disrupted? Reprod Biol Endocrinol 2006;4(1):30. PMID: 16737536
6. Yazar S. The subchronic toxic effects of plant growth promoters in mice. Ankara Univ Vet Fakultesi Derg 2008;55(1):17-21. Link
7. Bhadoria P, Nagar M, Bahrioke V, Bhadoria AS. Effect of ethephon on the liver in albino rats: a histomorphometric study. Biomed J 2015;38(5):421-7. PMID: 25900927

8. Bhadoria P, Nagar M, Bharihoke V, Bhadoria AS. Ethephon, an organophosphorous, a fruit and vegetable ripener: has potential hepatotoxic effects? *J Family Med Prim Care* 2018;7(1):179-83. PMID: 29915756
9. Hennighausen G, Tiefenbach B. Mechanism of acute toxic effects of chlorocholine chloride and 2-chloroethyl phosphonic acid (Ethephon). *Arch Exp Veterinarmed* 1978;32(4):609-21. PMID: 727875
10. Haux JE, Quistad GB, Casida JE. Phosphobutrylcholinesterase: phosphorylation of the esteratic site of butyrylcholinesterase by ethephon [(2-chloroethyl) phosphonic acid] dianion. *Chem Res Toxicol* 2000;13(7):646-51. PMID: 10898597
11. Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen IM, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;179(1):1-12. PMID: 11884232
12. Abd Eldaim MA, Tousson E, El Sayed IE, Awd WM. Ameliorative effects of saussurea lappa root aqueous extract against ethephon-induced reproductive toxicity in male rats. *Environ Toxicol* 2019;34(2):150-9. PMID: 30315693
13. Hodjat M, Baeeri M, Rezvanfar MA, Rahimifard M, Gholami M, Abdollahi M. On the mechanism of genotoxicity of ethephon on embryonic fibroblast cells. *Toxicol Mech Methods* 2017;27(3):173-80. PMID: 27997273
14. Al-Twaty NH. Mutagenic effects of ethephon on albino mice. *J Biol Sci* 2006;6(6):1041-6. Link
15. Nada AT, Saleha YM. Genotoxic effect of an organophosphorus pesticide "ethephon" on somatic and germ cells of male mice. *Biosci Biotechnol Res Asia* 2016;5:1-8. Link
16. Sadeghi N, Tavalaei M, Nasr-Esfahani MH. A cellular perspective on the importance of oxidative stress effects on sperm. *J Ardabil Univ Med Sci* 2018;18(1):7-20. Link
17. Li W, Kabbage M, Dickman MB. Transgenic expression of an insect inhibitor of apoptosis gene, SfiAP, confers abiotic and biotic stress tolerance and delays tomato fruit ripening. *Physiol Mol Plant Pathol* 2010;74(5-6):363-75. Link
18. Byers SL, Payson SJ, Taft RA. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology* 2006;65(9):1716-26. PMID: 16271754
19. González R, Ruiz-León Y, Gomendio M, Roldan ER. The effect of glucocorticoids on mouse oocyte in vitro maturation and subsequent fertilization and embryo development. *Toxicol In Vitro* 2010;24(1):108-15. PMID: 19733225
20. Abou-Zeid SM, Allam T, El-Bahrawy A, Mohamed M. Ameliorating effects of green tea on ethephon-induced immunotoxicity and oxidative stress in mice. *Int J Pharm Sci Sci Res* 2018;4:1. Link
21. Wang B, Zhao W, Liang S, Li H, Wang G. Effect of ethephon on oxidative stress in kunming mice [J]. *Chin J Pesticide Sci* 2010;1:20. Link
22. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exper Physiol* 1997;82(2):291-5. Link
23. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2002;7(9):405-10. PMID: 12234732
24. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2004;82(3):593-600. PMID: 15374701
25. Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radic Biol Med* 1992;13(1):47-53. PMID: 1628853
26. Smeenk JM, Verhaak CM, Vingerhoets AJ, Sweep CG, Merkus JM, Willemsen SJ, et al. Stress and outcome success in IVF: the role of self-reports and endocrine variables. *Hum Reprod* 2005;20(4):991-6. PMID: 15665011
27. Haux JE, Lockridge O, Casida JE. Specificity of ethephon as a butyrylcholinesterase inhibitor and phosphorylating agent. *Chem Res Toxicol* 2002;15(12):1527-33. PMID: 12482234
28. Liasova MS, Schopfer LM, Kodani S, Lantz SR, Casida JE, Lockridge O. Newly observed spontaneous activation of ethephon as a butyrylcholinesterase inhibitor. *Chem Res Toxicol* 2013;26(3):422-31. PMID: 23410221