

مقاله پژوهشی

اثر عصاره‌ی اتیل استاتی یونجه بر پوکی استخوان در موش‌های تخمدان برداری شده

هادی سمیزه*، سیدرضا فاطمی طباطبایی، نعیم عرفانی‌مجد، علی شهریاری، صدیقه چاجی

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

دریافت: ۸ مهر ۱۳۹۹

پذیرش: ۱۶ مهر ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به غنی بودن یونجه از فیتواستروژن‌ها، و تاثیر مثبت فیتواستروژن بر استخوان، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره اتیل استاتی یونجه بر پوکی استخوان ناشی از برداشت تخمدان بود.

روش‌ها: سی سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار ۳ ماهه، دو هفته پس از تخمدان برداری، به طور تصافی به گروه‌های شم (جراحی بدون تخمدان برداری)، تخمدان برداری، بدون تخمدان برداری + ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره در جیره، تخمدان برداری + ۲ گرم بر کیلوگرم عصاره در جیره، و تخمدان برداری + ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره در جیره، تقسیم شدند. پس از ۷۵ روز تیمار، مقادیر آلکالین فسفاتاز، کلسیم و فسفر در سرم و استخوان ران، و منیزیم و استروژن در سرم اندازه‌گیری شدند. همچنین تراکم مواد معدنی استخوان ران و تغییرات بافتی آن در گروه‌های مورد مطالعه مقایسه شد.

یافته‌ها: مقادیر کلسیم، فسفر، منیزیم و تراکم مواد معدنی در گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نداشت. غلظت استروژن در گروه‌های تخمدان برداری شده کمتر از گروه کنترل و گروه کنترل دریافت‌کننده عصاره بود. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سرم گروه تخمدان برداری شده حداکثر و در استخوان ران این گروه حداقل بود ($p < 0.05$). کاهش ضخامت استخوان متراکم، ضخامت تیغه استخوان اسفنجی و کاهش قطر و تعداد سیستم هاورس در گروه تخمدان برداری شده کم شده بود که به دنبال مصرف عصاره به صورت وابسته به دوز بهبود یافت. در گروه بدون تخمدان برداری + ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره در جیره، نیز این پارامترها افزایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصاره اتیل استاتی یونجه با عوارض استخوانی ناشی از کمبود استروژن در موش‌های تخمدان برداری شده مقابله می‌کند. به نظر می‌رسد این اثر از طریق تعدیل افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز سرم و کاهش سطح سرمی استروژن ناشی از تخمدان برداری باشد.

واژه‌های کلیدی: تخمدان برداری، پوکی استخوان، عصاره اتیل استاتی یونجه، موش

مقدمه

پوکی استخوان یک بیماری متابولیک مشخص استخوان است که با کاهش توده استخوانی، انحطاط ساختار بافت استخوان و افزایش شکنندگی استخوان همراه است. دلیل غالب پوکی استخوان در بعد از یائسگی زنان کمبود استروژن در تخمدان است [۱].

این بیماری به عنوان یک معضل بزرگ در سلامت عمومی جامعه خصوصاً زنان شناخته شده است [۲]. سازمان سلامت جهان در سال ۲۰۰۲ پوکی استخوان را به عنوان چهارمین دشمن اصلی بشر بعد از سکتة قلبی، سکتة مغزی و سرطان و

مهمترین علت شکستگی استخوان در جهان اعلام کرد [۳]. براساس مطالعات انجام گرفته، بیش از ۲۰۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به پوکی استخوان مبتلا هستند [۴]. همچنین نتایج مطالعات مشخص نموده که تراکم استخوان افراد سالم ایرانی از استاندارد جهانی کمتر است که نشان‌دهنده استعداد بیشتر نژاد ایرانی به ابتلا به پوکی استخوان است [۵]. زنان در تمام سنین توده استخوانی کمتری نسبت به مردان دارند و در طول عمرشان حدود ۴۰٪ از کلسیم اسکلتی خود را از دست می‌دهند [۶]. در زنان روند فرسایش استخوان پس از یائسگی به علت

تخمندان برداری شده (OVX)، شاهد درمان (sham + ۴)، تخمدان برداری شده + درمان با دوز پایین (OVX + ۲) و تخمدان برداری شده + درمان با دوز بالا (OVX + ۴) تقسیم شدند. گروه‌های شاهد و شاهد درمان جراحی شدند و تخمدان آن‌ها پس از لمس به محل اصلی بازگردانده شد. سایر گروه‌ها مورد جراحی تخمدان برداری قرار گرفتند. به غذای گروه OVX + ۲ مقدار ۲ mg/kg و به غذای گروه‌های sham + ۴ و OVX + ۴ مقدار ۴ mg/kg عصاره یونجه اضافه شد. روش تحقیق و رفتار با حیوانات در مراحل مختلف مطالعه با تایید شورای تحصیلات تکمیلی دانشکده دامپزشکی اهواز و طبق دستورالعمل‌های مربوطه به انجام رسید.

روش عصاره‌گیری گیاه یونجه

در هر مرحله از عصاره‌گیری به ۱۵۰ گرم یونجه خشک پودر شده ۱۰۰۰ سی سی اتانول ۹۶ درصد و ۵۰۰ سی سی آب مقطر اضافه شد. مخلوط توسط دستگاه همزن به مدت ۷۲ ساعت همزده شد. سپس مخلوط حاصل به وسیله کاغذ صافی صاف شد و درون بن‌ماری گذاشته شد تا الکل آن تبخیر شود. پس از تبخیر الکل، به میزان ۱/۵ برابر حجم عصاره باقیمانده اتیل استات اضافه شد و حدود ۳۰ دقیقه توسط دستگاه همزن آهنربایی مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت حداقل ۳۰ دقیقه بدون حرکت قرار داده شد تا حالت دو فاز ایجاد شود. فاز رویی را با استفاده از پیپت جدا کردیم و درون اجاق تغلیظ کردیم. در نهایت، پس از محاسبه مقدار ماده خشک، عصاره تغلیظ شده به نسبت لازم با جیره غذایی پودر شده موش‌ها مخلوط گردی و حداقل طی ۲۴ ساعت رطوبت‌گیری شد [۱۴]. برای تعیین LD50 خوراکی عصاره تهیه شده از راهنمای شماره ۴۲۵ استفاده شد. حداکثر دوزهای قابل استفاده در این آزمون ۲۰۰۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود ولی استفاده خوراکی این دوزها منجر به تلف شدن حتی یک حیوان هم نشد. لذا محدودیت دوز در این مطالعه در نظر گرفته نشد [۱۵].

تهیه مقاطع بافتی

جهت تهیه نمونه از استخوان ابتدا باید کلسیم‌گیری انجام شود. برای این منظور ۳۰ سی سی اسید فرمیک را با ۱۰ سی سی فرمالین مخلوط نمودیم و سپس میزان ۲۰۰ سی سی آب مقطر

کاهش سطح هورمون استروژن و به طبع آن روند فرسایش استخوان‌ها در مقایسه با روند تشکیل استخوان سرعت می‌گیرد [۷].

فیتواستروژن‌ها ترکیبات گیاهی پلی‌فنولیک غیر استروئیدی با فعالیت بیولوژیکی استروژن مانند هستند. دسته‌های مهم آن‌ها عبارتند از ایزوفلاون‌ها (جنستین، داییدزئین، بیوچنین A)، لیگنان‌ها (ایترولاکتون، اینترودیول)، کامستنس (کامسترول) و فلاونوئیدها [۸]. ایزوفلاون‌ها عمدتاً در حبوبات، غلات و سویا، لیگنان‌ها در دانه‌های روغنی، غلات، حبوبات، میوه و سبزیجات، کامسترول در ماش، جوانه لوبیا، بذر کتان، جوانه شبدر و به خصوص در یونجه متمرکز است [۹، ۱۰].

فیتواستروژن‌ها دارای خواص استروژنیک و اثرات ضد استروژنیک هستند و معمولاً به گیرنده‌های استروژن متصل می‌شوند [۱۱]. به دلیل شباهت ساختاری فیتواستروژن‌ها به استروژن مطالعات زیادی اثرات مثبت فیتواستروژن‌ها را بر علائم بعد از یائسگی، بیماری‌های قلبی عروقی، مشکلات استخوانی و سرطان پستان نشان داده‌اند. براساس این اطلاعات فیتواستروژن‌ها به عنوان یک عامل بالقوه مهم در جلوگیری از تحلیل استخوان می‌باشند [۱۲].

یونجه با نام علمی *Medicago sativa* از خانواده Fabaceae (باقالییان) و گونه *M. Sativa*، یک گیاه ارزشمند غنی از پروتئین، سیستئین و مواد معدنی (کلسیم، مس، آهن، منیزیوم، منگنز، فسفر، روی) و ویتامین‌های (A, B, C, D, E, K) مواد فتوشیمیایی (کاروتن، کلروفیل، کومارین، ایزوفلاون، آلکالوئیدها، ساپونین) و حاوی متابولیت‌های ثانویه گیاهی (فیتواستروژن، ایزوفلاون‌ها و کومسترول) و اجزای ضد تغذیه‌ای (فیتات، L-کاناوانین، ساپونین) است [۱۳].

با توجه به غنی بودن یونجه از فیتواستروژن‌ها، و تاثیر مثبت فیتواستروژن بر استخوان، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره یونجه بر پوکی استخوان ناشی از برداشت تخمدان بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه روی ۴۵ سر موش صحرایی ماده نژاد ویستار با حداقل سن ۳ ماهه در محدوده وزنی ۱۷۰ تا ۲۲۰ گرم انجام شد. حیوانات دو هفته بعد از جراحی به طور تصادفی به گروه‌هایی ۹ تایی شامل گروه‌های شاهد (sham)،

کیت‌ها ساخت ایران بودند.

پس از ۷۵ روز تیمار، حیوانات توسط ترکیب کتامین زایلین بیهوش شدند. سپس خونگیری از چشم با استفاده از لوله موئینه غیر هپارینه صورت گرفت. به منظور تهیه سرم، نمونه‌های خون در دور ۴۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سرم آن‌ها جدا گردید. پس از آسان‌کشی، استخوان‌های ران راست و چپ جدا گردید. در سرم خون مقادیر استروژن، کلسیم، فسفر، منیزیم و آلکالین فسفاتاز اندازه‌گیری شد. از استخوان ران راست برای اندازه‌گیری دانسیته مینرال استخوان^۱ استفاده شد. نیمی از استخوان ران چپ را در هاون چینی به صورت پودر در آورده و سپس در سالیین سرد هموژنیزه شد و مایع رویی با استفاده از سمپلر جدا و در آن میزان آلکالین فسفاتاز اندازه‌گیری شد و رسوبات باقی مانده در میکروتیوب را در کوره سوزانده و در خاکستر حاصل مقادیر کلسیم و فسفر اندازه‌گیری شد. از نیمه دیگر ران چپ برای بررسی تغییرات بافتی استفاده شد [۱۷].

محاسبات آماری

از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و پس از آزمون LSD برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. همچنین در تمامی موارد $p < 0/05$ به عنوان معیار حداقل اختلاف معنی‌دار آماری در طی آنالیز داده‌ها در نظر گرفته شد.

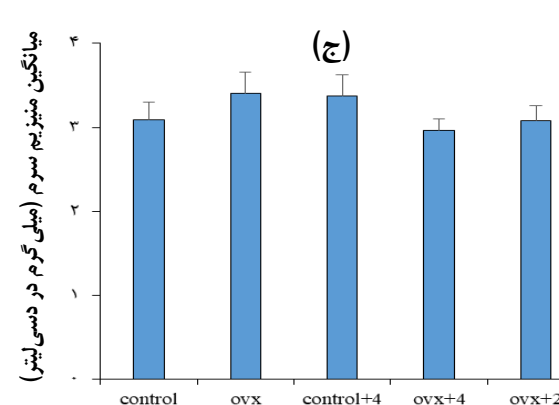
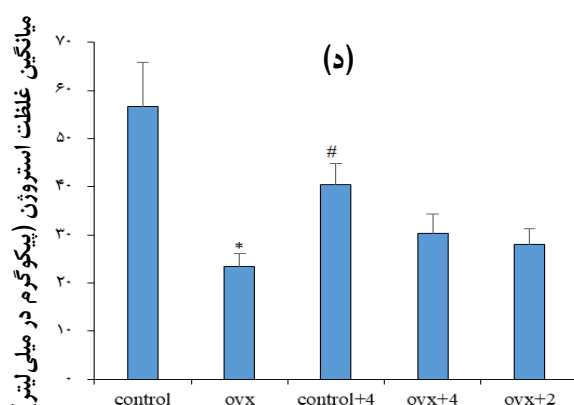
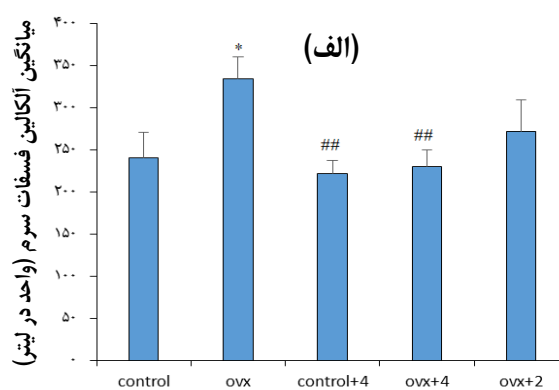
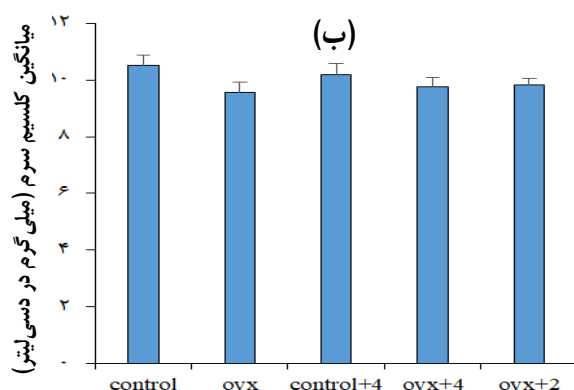
یافته‌ها

با توجه به نمودار ۱ الف مشاهده می‌شود که متعاقب برداشتن تخمدان موش‌ها، میزان آلکالین فسفاتاز سرم بطور معنی‌داری افزایش می‌یابد. پس از مصرف مزمن دوز ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه این افزایش، مهار شده و به حد موش‌های سالم (کنترل) می‌رسد. میزان کلسیم و منیزیم سرم در گروه‌های مختلف تغییر معنی‌داری نداشت (نمودار ۱ ب و ج). متعاقب برداشتن تخمدان موش‌ها، سطح استروژن سرم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (نمودار ۱ د). تجویز عصاره یونجه با این‌که موجب افزایش میزان استروژن شد اما این تغییر به حد کنترل نرسید و معنی‌دار هم نبود. متعاقب برداشتن تخمدان موش‌ها، میزان آلکالین فسفاتاز استخوان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (نمودار ۲ الف).

به آن اضافه کردیم. نمونه‌ها را به مدت ۵ تا ۶ روز در این محلول گذاشتیم تا کلسیم‌گیری به خوبی انجام و بافت نرم شود تا برای برش‌گیری آماده شود. پس از گرفتن مقطع طولی و عرضی از نمونه‌ها آن‌ها را درون سبد مخصوص گذاشته و به مدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت درون الکل ۷۰ درصد قرار دادیم. سپس نمونه‌ها با آب جاری شستشو داده می‌شوند و مراحل مختلف پاساژ بافتی شامل آگیری، شفاف‌سازی، و آغستگی به پارافین با استفاده از دستگاه هیستوکینت انجام گرفت. پس از قالب‌گیری با پارافین برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم تهیه گردید و برش‌های مورد نظر را بر سطح آب گرم با دمای ۴۸-۴۵ پهن کردیم تا چین و چروک آن برطرف گردد. سپس نمونه‌ها بر روی لام منتقل شده و پس از خشک‌شدن با همتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد [۱۶]. اندازه‌گیری دانسیته استخوان با روش دستی صورت گرفت. علاوه بر بررسی تغییرات ساختاری، تغییرات میکرومتری بافت استخوانی متراکم و اسفنجی شامل ضخامت و پراکندگی شبکه‌های استخوانی، سیستم‌های هاورس، تعداد و اندازه سلول‌های استئوبلاست، استئوسیت، استئوکلاست و همچنین اندازه حفرات مغز استخوان و ساختار بافت مغز استخوان مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعات میکرومتری با استفاده از لنز Digital-Dino و نرم افزار Dino-Capture در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری و محاسبه شد. تعیین سطح سرمی منیزیم و کلسیم با استفاده از کیت مربوطه، اندازه‌گیری فسفر از روش احیای مولیبدات، اندازه‌گیری استروژن با کیت الایزای رقابتی و آلکالین فسفاتاز با استفاده از روش واکنش فسفات با p-نیتروفنل و تولید رنگ بنفش انجام شد [۱۶]. برای اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز نیمی از استخوان ران چپ در سالیین سرد هموژنیزه و پس از سانتریفوژ کردن مایع رویی جدا و میزان آلکالین فسفاتاز استخوان توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد [۱۶].

برای اندازه‌گیری کلسیم و فسفر استخوان رسوبات باقی‌مانده حاصل از هموژنیزاسیون وزن شد و درون بوتله چینی در کوره با دمای ۳۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب سوزانده شد. خاکستر حاصل به وسیله اسید کلریدریک ۳ نرمال حل شد و به‌وسیله آب مقطر رقیق شد [۱۶]. کیت‌های مورد استفاده جهت انجام آزمایشات از شرکت پارس آزمون تهیه شد. کیت اندازه‌گیری استروژن از شرکت ایده‌آل خریداری شد. تمام

¹ Bone mineral density



نمودار ۱-۱ اثر مصرف عصاره یونجه بر میزان سرمی آلکالین فسفاتاز (الف)، کلسیم (ب)، منیزیم (ج)، و استروژن (د) در موش‌های تخمدان برداری شده. Control: سالم، OvX: تخمدان برداری شده، ۲ یا ۴: دوزهای عصاره به ازای گرم بر کیلوگرم وزن موش. * نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p < 0.05$ است. # نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه تخمدان برداری شده با $p < 0.05$ و ### نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه تخمدان برداری شده با $p < 0.01$ است.

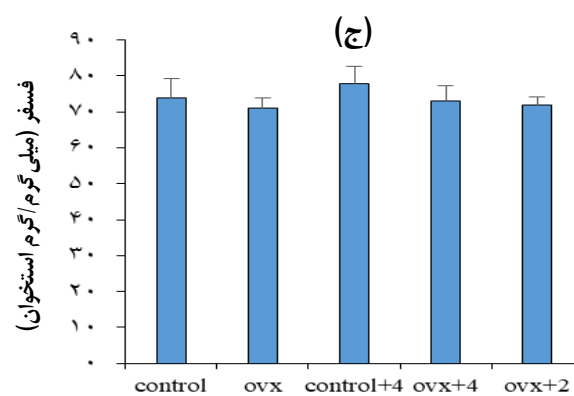
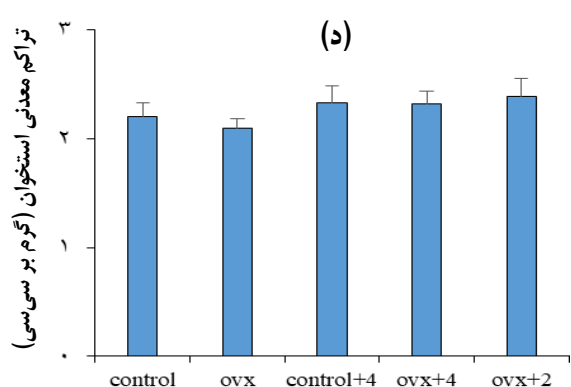
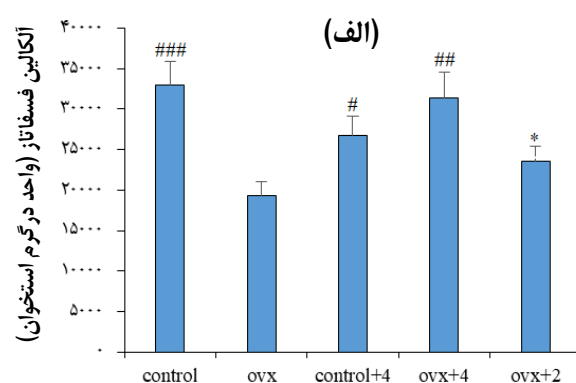
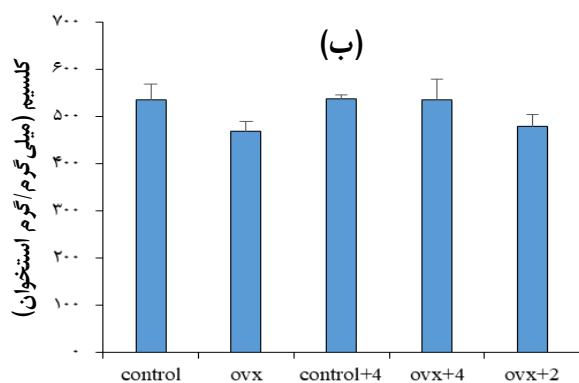
هسته سلول‌ها نیز کشیده و تیره مشاهده گردیدند (شکل ۱ج). تجویز مزمن عصاره یونجه ۴ گرم بر کیلوگرم در گروه کنترل موجب افزایش قطر سلول‌های استئوسیت (شکل ۱د) گردید. تجویز مزمن عصاره یونجه در مقادیر ۲ و ۴ گرم بر کیلوگرم به موش‌های تخمدان برداری شده بایزرگ شدن سلول و لاکونا، هسته کروی و یوکروماتین و بهبود ساختار سلول‌های استئوسیت (شکل ۱ه و ۱و) همراه بود.

چنان که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، ضخامت کلی استخوان در گروه تخمدان برداری شده نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشت ($p < 0.001$). قطر و تعداد سیستم هاورس نیز در گروه تخمدان برداری شده نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشت ($p < 0.001$).

ضخامت کلی استخوان و تعداد سیستم‌های هاورس در گروه کنترل دریافت کننده عصاره یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت

پس از مصرف مزمن دوز ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه این افزایش، مهار شده و به حد موش‌های سالم (کنترل) رسید. میزان کلسیم، منیزیم و تراکم معدنی استخوان در گروه‌های سالم و تخمدان برداری شده تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت (نمودار ۲ب، ۲ج و ۲د).

ساختار استخوان ران موش‌ها در گروه‌های مختلف مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. در گروه کنترل استخوان متراکم با ساختار طبیعی از تیغه‌های استخوانی با ماتریکس اسیدوفیلی و سلول‌های استئوسیت با سیتوپلاسمی اسیدوفیلی و هسته‌ای یوکروماتین در داخل لاکوناها تشکیل شده‌اند (شکل ۱الف و ۱ب). سیستم‌های هاورس به صورت متراکم و با ساختار طبیعی از تیغه‌های متحدالمرکزی تشکیل شده‌اند. در گروه تخمدان برداری شده، ساختار استخوان دستخوش تغییرات ساختاری قابل توجهی گردید به طوری که سلول‌های استئوسیت از حالت کروی به شکل کشیده و با اندازه و قطر کوچکتر و



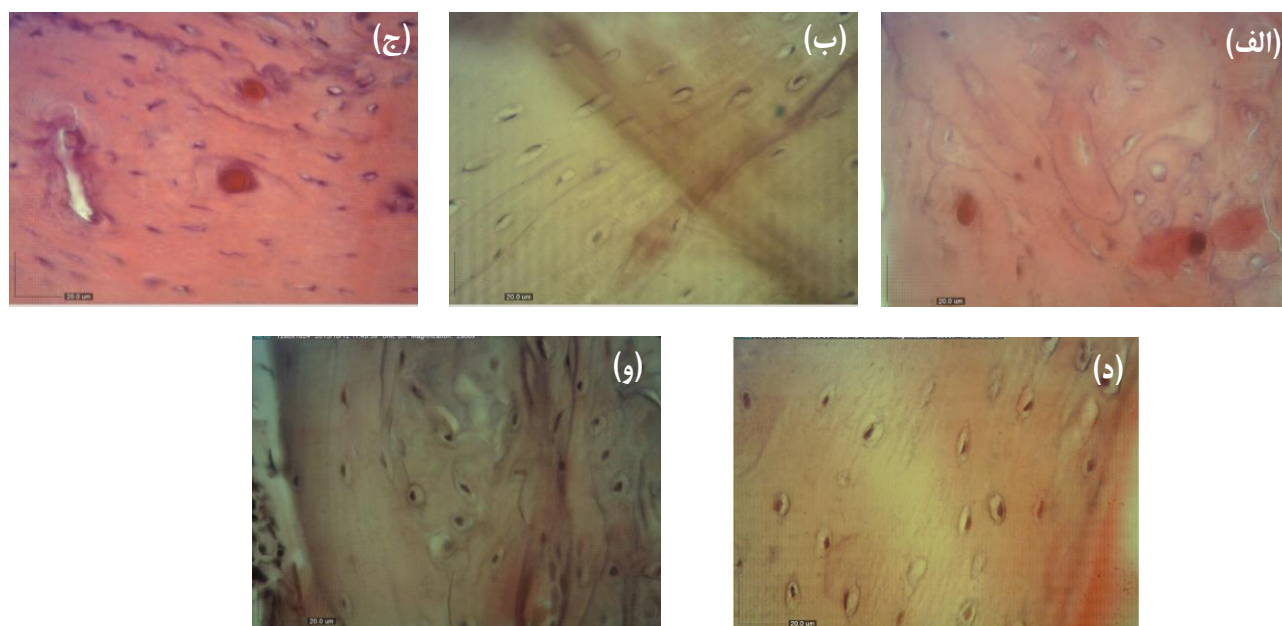
نمودار ۲- اثر مصرف عصاره یونجه بر میزان سرمی آلکالین فسفاتاز (الف)، کلسیم (ب)، فسفر (ج)، و تراکم معدنی استخوان (د) در موش‌های تخمدان برداری‌شده. Control: سالم، Ovx: تخمدان برداری‌شده، ۲ یا ۴: دوزهای عصاره به ازای گرم بر کیلوگرم وزن موش. * : نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.05$ است. # : نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه تخمدان برداری‌شده با $p < 0.05$ ، ### : نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه تخمدان برداری‌شده با $p < 0.01$ و #### : نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه تخمدان برداری‌شده با $p < 0.001$ است.

ساختار طبیعی استخوان اسفنجی از تیغه‌های استخوانی ضخیم و پیوسته با ماتریکس اسیدوفیلی و سلول‌های استئوسیت کروی شکل طبیعی با سیتوپلاسم اسیدوفیلی و هسته یوکروماتین در لاکونا و در ضخامت تیغه‌ها تشکیل شده است. سلول‌های استئوبلاست بیشتر در کنار تیغه‌ها به فرم فعال مشاهده گردیدند. در گروه تخمدان برداری‌شده (شکل ۲ب) تیغه‌های استخوانی به‌طور قابل‌توجهی کوتاه و نازک شده و ساختار مشبک و بهم پیوسته تیغه‌ها کمتر مشاهده گردید. حفرات بین تیغه‌ها بسیار وسیع و به هم پیوسته بودند و سلول‌های استئوسیت کشیده و کوچکتر با هسته‌های تیره و کشیده مشاهده شدند. سلول‌های استئوبلاست فعال در کنار تیغه‌ها، کمتر مشاهده شد. در گروه کنترل دریافت‌کننده عصاره یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم (شکل ۲ج) ضخامت زیاد تیغه‌ها، به هم پیوستگی، نظم و قطر حفرات قابل توجه بود. در گروه تخمدان برداری‌شده دریافت‌کننده عصاره یونجه با دوز ۲ گرم

($p < 0.01$). قطر سیستم‌هاورس در گروه کنترل دریافت‌کننده یونجه با دوز ۴ نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). ضخامت تیغه‌ها در گروه تخمدان برداری‌شده نسبت به همه گروه‌ها کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0.001$).

ضخامت کلی استخوان، تعداد و قطر سیستم‌های هاورس در گروه تخمدان برداری‌شده درمان شده با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه نسبت به گروه تخمدان برداری‌شده افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$). ضخامت کلی استخوان، تعداد و قطر سیستم‌های هاورس در گروه تخمدان برداری‌شده درمان شده با دوز ۲ گرم بر کیلوگرم عصاره یونجه نسبت به گروه تخمدان برداری‌شده افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.001$).

ساختار طبیعی استخوان اسفنجی در گروه‌های مورد مطالعه در شکل نشان داده شده است. در گروه کنترل (شکل ۲الف).



شکل ۱- اثر مصرف عصاره یونجه بر ساختار میکروسکوپی استخوان متراکم در موش‌های تخمدان برداری شده. (الف) گروه کنترل، سیستم‌های هاورس، (ب) گروه کنترل، تیغه‌های استخوانی و سلول‌های استئوسیت کروی و هسته یوکروماتین؛ (ج) گروه تخمدان برداری شده، کوچک شدن سلول استئوسیت با هسته‌های تیره و کشیده قابل توجه است، (د) کنترل دریافت کننده عصاره یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم، با افزایش مشهود قطر سلول‌های استئوسیت، (ه) گروه تخمدان برداری شده دریافت کننده عصاره یونجه با دوز ۲ گرم بر کیلوگرم، همراه با بهبود ساختار سلول‌های استئوسیت که حاصل بزرگ شدن سلول و لاکونا، هسته کروی و یوکروماتین است، (و) گروه تخمدان برداری شده دریافت کننده عصاره یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم، همراه با بهبود ساختار سلول‌های استئوسیت که حاصل بزرگ شدن سلول و لاکونا، هسته کروی و یوکروماتین است. تصاویر با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و بزرگنمایی ۴۰ تهیه شده‌اند.

ضخیم و پیوسته بودند. در مقابل در گروه تخمدان برداری شده، ساختار استخوان دستخوش تغییرات ساختاری قابل توجهی شده بود. به طوری که سلول‌های استئوسیت از حالت کروی به شکل کشیده تبدیل شده بود و طول آن‌ها کوچکتر و هسته این سلول‌ها نیز کشیده و تیره بود. در استخوان اسفنجی موش‌های صحرایی این گروه تیغه‌های استخوانی به طور قابل توجهی کوتاه و نازک شده بودند و ساختار مشبک و بهم پیوسته تیغه‌ها کمتر مشاهده گردید. حفرات بین تیغه‌ها بسیار وسیع و به هم پیوسته بودند و سلول‌های استئوبلاست فعال کمتری در کنار تیغه‌ها، مشاهده شد. همچنین ضخامت استخوان متراکم، قطر و تعداد سیستم هاورس و ضخامت تیغه‌های استخوان اسفنجی در این گروه نسبت به گروه کنترل کاهش یافته بود.

در استخوان مونوسیت‌ها اینترلوکین یک ترشح می‌کنند، که این ماده و سایر سیتوکین‌ها بر استئوبلاست‌ها اثر می‌کنند و باعث می‌شوند که استئوبلاست‌ها اینترلوکین ۶ ترشح کنند، که ماده اخیر یک محرک قوی برای استئوکلاست‌ها است. استروژن از تولید بیش از حد اینترلوکین یک در استخوان

بر کیلوگرم (شکل ۱۲) افزایش ضخامت، پیوستگی تیغه‌ها و نظم حفرات به وضوح مشاهده شد. در گروه تخمدان برداری شده دریافت کننده عصاره یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم (شکل ۱۳) افزایش ضخامت، پیوستگی تیغه‌ها و نظم حفرات به وضوح مشاهده شد.

بحث

پوکی استخوان یک بیماری متابولیک مشخص استخوان است که با کاهش توده استخوانی، انحطاط ساختار بافت استخوان و افزایش شکنندگی استخوان همراه است و احتمال ابتلا به آن در زنان بیشتر از مردان است [۱]. در استخوان استئوپروتیک کورتکس و تراپیکول‌ها بسیار نازک شده و با عدم تشکیل بافت استئوئید کافی همراه است. این بیماری به عنوان یک معطل بزرگ در سلامت عمومی جامعه خصوصاً زنان شناخته شده است [۱۸]. حدود ۸۰ درصد افراد مبتلا به پوکی صورت متراکم و ساختاری طبیعی داشت و دارای تیغه‌های متحدالمرکز بود. همچنین در حیوانات سالم تیغه‌های استخوانی

جدول ۱- اثر مصرف عصاره یونجه بر ضخامت استخوان، تعداد سیستم هاورس، قطر سیستم هاورس و ضخامت تیغه در موش‌های تخمدان برداری شده

گروه‌ها	مشخصات مورد مطالعه	ضخامت استخوان متراکم	تعداد سیستم هاورس	قطر سیستم هاورس	ضخامت تیغه
کنترل		۳۳۷/۸ ± ۵/۹	۲۲/۶ ± ۱/۲	۳۰/۲ ± ۱/۴	۵۲/۶ ± ۲/۳
تخمدان برداری شده		***۱۷۲/۷ ± ۶/۹	**۷ ± ۱/۲	***۸/۰ ± ۱/۸	***۲۱/۶ ± ۱/۹
کنترل به همراه ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره		**۳۷۲/۰ ± ۴/۹	**۲۸/۸ ± ۱/۲	*۳۵/۷ ± ۲/۵	۴۹/۸ ± ۱/۷
تخمدان برداری شده به همراه ۴ گرم بر کیلوگرم عصاره		###۲۷۲/۰ ± ۴/۹	###۱۴/۴ ± ۰/۵	###۲۷/۸ ± ۱/۷	###۴۶/۳ ± ۵/۵
تخمدان برداری شده به همراه ۲ گرم بر کیلوگرم عصاره		###۲۶۴/۰ ± ۱/۹	###۱۱ ± ۱/۱	###۲۶/۴ ± ۰/۶	###۳۸/۲ ± ۱/۵

نتایج نشان دهنده میانگین \pm انحراف معیار از میانگین است. * : نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p < 0/05$ ، ** : نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه تخمدان برداری شده با $p < 0/01$ و *** : نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه کنترل با $p < 0/001$ است. ### : نشان دهنده اختلاف معنی دار با گروه تخمدان برداری شده با $p < 0/001$ است.

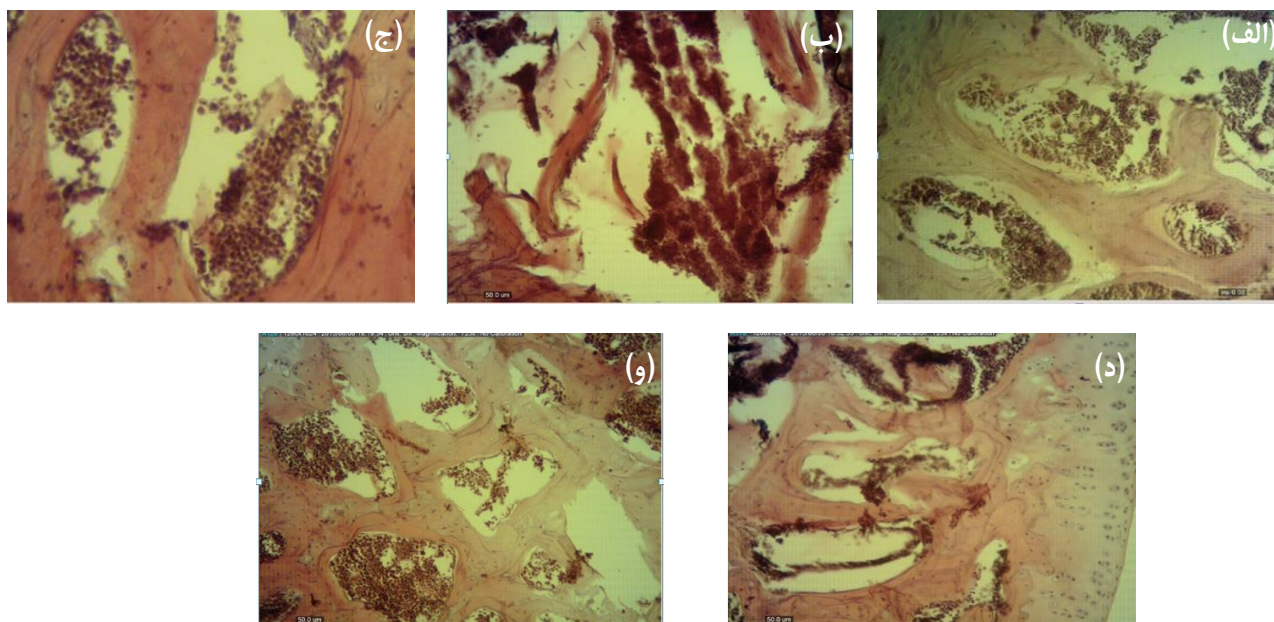
شده در سرم خون و استخوان نشان داد که میزان کلسیم، فسفر و منیزیم سرم و کلسیم، فسفر و تراکم مواد معدنی استخوان در گروه‌های مختلف تفاوت معنی داری نداشت. احتمالاً عدم تحلیل شدید استخوان در کنار تنظیمات هورمونی، سطح این مواد را در سرم تنظیم نموده یا تامین آن‌ها از طریق جیوه مورد استفاده از افت محسوس آن‌ها ممانعت نموده است. البته در این مطالعه، مقدار تراکم استخوانی و مقادیر کلسیم و فسفر در گروه تخمدان برداری شده کمتر از سایر گروه‌ها بود، ولی اختلاف آن‌ها در گروه‌های مختلف معنی دار نبود. لازم به ذکر است، که در بیشتر مطالعات این پارامترها به صورت معنی داری در گروه‌های تخمدان برداری شده کاهش یافته است. در مطالعه‌ای دیگر با عنوان «آنتی میوستاتین کمبود مواد معدنی استخوان را در موش‌های تخمدان برداری شده کاهش می‌دهد.» دریافتند که میزان کلسیم و فسفر سرم در گروه کنترل نسبت به گروه تخمدان برداری شده کمتر بود و میزان کلسیم استخوان در گروه تخمدان برداری شده کاهش یافته و فسفر استخوان به نسبت خیلی کم افزایش یافته است. به هر حال، با توجه به نتایج بافتی این مطالعه که بیانگر کاهش مقدار استخوان در گروه‌های تخمدان برداری شده است، کاهش سطح این پارامترها معقول به نظر می‌رسد [۲۲].

آلکالین فسفاتاز باعث هیدرولیز فسفونواسترها و آزاد شدن فسفات معدنی می‌شود و در مینرالیزاسیون استخوان نقش دارد [۲۳]. آلکالین فسفاتاز موجب می‌شود تا پیروفسفات معدنی در طول فرآیند معدنی شدن هیدرولیز گردد. آلکالین فسفاتاز بافتی غیر اختصاصی^۲ موجب می‌شود تا پیروفسفات معدنی که

جلوگیری می‌کند. بنابراین چنانچه استروژن موجود نباشد، فعالیت استئوکلاست‌ها افزایش می‌یابد و روند پوکی استخوان تسهیل می‌شود. البته خود استروژن نیز با اثر بر روی استئوبلاست موجب افزایش ساخت استخوان می‌شود [۱۹]. در مطالعه حاضر، برداشت تخمدان‌ها به عنوان منشاء اصلی تولید استرادیول در حیوان ماده باعث کاهش قابل ملاحظه سطح استرادیول شد و بنابراین احتمالاً کاهش آن با توجه به مکانیسم فوق باعث پیشرفت و توسعه عوارض استخوانی شده است.

در مطالعه حاضر استفاده از عصاره یونجه نه تنها در گروه‌های تخمدان برداری شده دریافت کننده عصاره یونجه باعث بزرگ شدن سلول‌های استئوسیت، لاکونا، افزایش ضخامت استخوان متراکم، افزایش ضخامت تیغه استخوان اسفنجی و افزایش تعداد سیستم هاورس شد بلکه در گروه کنترل دریافت کننده عصاره یونجه نیز منجر به افزایش قطر سلول‌های استئوسیت، افزایش ضخامت استخوان متراکم، افزایش قطر و تعداد سیستم هاورس شد [۲۰]. بنابراین به نظر می‌رسد در تمام گروه‌های مصرف کننده عصاره یونجه شاخص‌های استخوانی بهبود یافته‌اند. احتمالاً عصاره مورد استفاده به دلیل دارا بودن ترکیباتی همچون پروتئین، سیستمین و مواد معدنی (کلسیم، مس، آهن، منیزیم، منگنز، فسفر، روی)، ویتامین‌ها (A, B, C, D, E, K)، مواد فتوشیمیایی (کاروتن، کلروفیل، کومارین، ایزوفلاون، آلکالوئیدها، ساپونین) و متابولیت‌های ثانویه گیاهی (فیتواستروژن، ایزوفلاون‌ها و کومسترول) اثرات مفید خود بر استخوان را اعمال نموده است [۲۱]. در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از پارامترهای اندازه‌گیری

² Tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP)



شکل ۲- اثر مصرف عصاره یونجه بر ساختار میکروسکوپی بافت اسفنجی استخوان در موش‌های تخمدان‌برداری‌شده. (الف) گروه کنترل، ساختار طبیعی استخوان، (ب) گروه تخمدان‌برداری‌شده، (ج) گروه کنترل دریافت‌کننده عصاره یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم، (د) گروه تخمدان‌برداری‌شده دریافت‌کننده عصاره یونجه با دوز ۲ گرم بر کیلوگرم، (ه) گروه تخمدان‌برداری‌شده دریافت‌کننده عصاره یونجه با دوز ۴ گرم بر کیلوگرم. تصاویر با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و بزرگنمایی ۱۰ تهیه شده‌اند.

یونجه باعث تقویت ساختار استخوان شده‌اند. نیاز است تا در مطالعات بعدی به این مساله پرداخته شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه این تحقیق را در قالب پایان‌نامه دوره ارشد فیزیولوژی تامین نمود تشکر و قدردانی می‌شود.

ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ه.س: انجام مطالعه و نگارش؛ ص.ج: کمک در انجام بخش عملی؛ س.ر.ف: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه.

بازدارنده تشکیل هیدروکسی آپاتیت است کاهش یابد و فسفات را برای تشکیل هیدروکسی آپاتیت آماده می‌کند [۲۴]. مقدار آلکالین فسفاتاز در سرم گروه اواریکتومی که از بیشترین آسیب استخوانی برخوردار بود بالاتر از گروه‌های کنترل و اواریکتومی درمان شده با دوز بالا بود، ولی در استخوان مقدار این آنزیم دقیقاً در جهت معکوس (مخالف) آن در سرم بود. این نشان می‌دهد، که در گروه اواریکتومی به دنبال کاهش استروژن آلکالین فسفاتاز استخوان دستخوش تغییرات قابل‌توجهی شده است. ولی در گروه‌های دریافت‌کننده یونجه مقدار آلکالین فسفاتاز افزایش یافته، در نتیجه ساختار استخوان بهبود یافته است.

نتیجه‌گیری

براساس مطالعه حاضر استفاده از عصاره الکلی یونجه باعث بهبود استخوان‌سازی و پیشگیری از عوارض برداشت تخمدان به عنوان یک مدل پوکی استخوان شد. یکی از مکانیسم‌های دخیل در این یافته افزایش سطح آلکالین فسفاتاز سرم می‌باشد. با توجه به اینکه یونجه منبع غنی از فیتواستروژن‌ها می‌باشد به نظر می‌رسد فیتواستروژن‌های موجود در عصاره

فهرست منابع

- [1] Looker A, Melton L, Harris T, Borrud L, Prevalence and trends in low femur bone density among older US adults: NHANES 2005–2006 compared with NHANES III. *J Bone Miner Res* (2010) 64-71.
- [2] Winzenberg T, Oldenburg B, Frenidin S, De Wit L, Jones G, A mother-based intervention trial for osteoporosis prevention in children. *Prev Med* 42 (2006) 21-26.
- [3] Shojaezadeh D, Sadeghi R, Tarrahi M, Asadi M, and Lashgarara B, Application of health belief model in prevention of osteoporosis in volunteers of Khorramabad city health centres. *Int J Neurosci Behav Sci* 4 (2012) 11-19.
- [4] Reginster J, Burlet N, Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone* 38 (2006) 4-9.
- [5] Haghighati F, and Nasri A, A comparative study of relationship between osteoporosis and periodontal disease. *J Dental Med* 20 (2007) 239-244.
- [6] Paget SA, Gibofsky Allan, Beary III JF, Sculco TP, Hospital for special surgery manual of rheumatology and outpatient orthopedic disorders: diagnosis and therapy. *Lippincott Williams & Wilkins*, 2005.
- [7] Tielens S, Wymeersch F, Declercq H, Cornelissen M, Effect of 17 β -estradiol on the in vitro differentiation of murine embryonic stem cells into the osteogenic lineage. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44 (2008) 368-378.
- [8] Cos P, De Bruyne T, Apers S, Berghe D, Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 69 (2003) 589-599.
- [9] Wang H, and Murphy P, Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42 (1994) 1666-1673.
- [10] Thompson L, Boucher A, Liu Z, Cotterchio K, Kreiger N, Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 54 (2006) 184-201.
- [11] Usui T, Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J* 53 (2006) 7-20.
- [12] Anderson N, Cotterchio M, Boucher B, Kreiger N, Phytoestrogen intake from foods, during adolescence and adulthood, and risk of breast cancer by estrogen and progesterone receptor tumor subgroup among Ontario women. *Int J Cancer* 132 (2013) 1683-1692.
- [13] Gawel E, Chemical composition of lucerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Sci Pol Technol Aliment* 11 (2012) 303-310.
- [14] Panovska TK, Kulevanova S, Stefova M, In vitro antioxidant activity of some Teucrium species (Lamiaceae). *Acta pharmaceutica* 452 (2005) 199-217.
- [15] Acute oral toxicity: Up-and-down procedure. [2001]. Available from: <https://archive.epa.gov/scipoly/sap/meetings/web/pdf/upanddown.pdf>
- [16] Hagemoser W, Goff J, Sanderson T, Haynes S, Osteopenic disease in growing pigs: diagnostic methods using serum and urine calcium and phosphorus values, parathormone assay, and bone analysis. *J Vet Diagn Invest* 12 (2000) 525-534.
- [17] Keenan M, Hegsted M, Jones K, Delany P, Kime J, Melancon E, Hong D, Comparison of bone density measurement techniques: DXA and Archimedes' principle. *J Bone Miner Res* 12 (1997) 1903-1907.
- [18] Ghaffari M, Tavassoli E, Esmailzadeh A, Hasanazadeh A, The effect of education based on health belief model on the improvement of osteoporosis preventive nutritional behaviors of second grade middle school girls in Isfahan. *Neurochem Int* 37 (2011) 55-70.
- [19] Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, Hayashi Y, Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand-mediated osteoclastogenesis. *J Endocrinol* 5 (2004) 2384–2391.
- [20] Annie S, Prabhu R, Malini S, Activity of *Wedelia calendulacea* Less. in post-menopausal osteoporosis. *Phytomedicine* 13 (2006) 43-48.
- [21] Moutsatsou P, The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *Hormones (Athens)* 6 (2007) 173-193.
- [22] Edrees H, Fahmy E, Anti-Myostatin reduces bone mineral loss in ovariectomized rats. *Clin Med Diagn* 4 (2014) 55-60.
- [23] Seebeck P, Bail H, Exner C, Schell H, Michel R, Amthauer H, Duda G, Do serological tissue turnover markers represent callus formation during fracture healing? *Bone* 37 (2005) 669-677.
- [24] Orimo H, The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77 (2010) 4-12.

Research paper

The effect of alfalfa ethyl acetate extract on osteoporosis in ovariectomized rats

Hadi Semizeh*, Seyed Reza Fatemi Tabatabaei, Naeem Erfanimajd, Ali Shahriari, Sedigheh Chaji

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 29 September 2020

Accepted: 7 October 2020

Abstract

Background and aims: Considering alfalfa as a source of phytoestrogens, and the positive effect of phytoestrogens on bone, the aim of this study was to evaluate effect of the ethyl acetate extract of alfalfa on the osteoporosis induced by ovariectomy.

Methods: Thirty 3-Month-Old female Wistar rats were accidentally divided to 5 groups, including sham, ovariectomy (ovx), sham+4 (4g/kg extract in diet), ovx+2 (2g/kg extract in diet) and ovx+4 (4g/kg extract in diet). Two weeks after ovariectomy or sham operation rat received ethyl acetate extract of alfalfa for 75 days. Then, the levels of alkaline phosphatase, calcium and phosphorus in serum and femur, and magnesium and estrogen in serum were measured. Thigh bone mineral density and tissue changes were also compared in the study groups.

Results: The amounts of calcium, phosphorus, magnesium and mineral density were not significantly different in the study groups. Estrogen concentration in ovx group was lower than the sham and the sham+4 groups. Among the experimental groups, rats in ovx group showed maximal activity of alkaline phosphatase in serum and the minimal activity in femur ($p < 0.05$). The bone density, thickness of spongy bone blade and diameter/ number of hoarse system decreased in ovx group. However, they were increased in ovx+2, ovx+4, and sham+4 groups.

Conclusion: It seems that the ethyl acetate extract of alfalfa decreases osteoporosis by modification of increase in the activity of serum alkaline phosphatase, and estrogen deficiency in ovariectomized rats.

Keywords: Ovariectomy, Osteoporosis, Alfalfa ethyl acetate extract, rat

Please cite this article as follows:

Semizeh H, Fatemi Tabatabaei SR, Erfanimajd N, Shahriari A, Chaji S, The effect of alfalfa ethyl acetate extract on osteoporosis in ovariectomized rats. *Iran J Physiol Pharmacol* 3 (2019) 270-279.

*Corresponding author: hadi.semizeh@gmail.com (ORCID ID: 0000-0003-4411-8961)