

بررسی اثر کافور بر سلول‌های لایدیگ و غلظت هورمون‌های LH و تستوسترون در موش آزمایشگاهی

نر بالغ نژاد Balb/C

مریم عابدینی^۱، وحیدحمایت خواه جهرمی^{۱*}، محسن فروزان فر^۲، حسین کارگر جهرمی^۳

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه زیست‌شناسی، جهرم، ایران

۲- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، گروه زیست‌شناسی، مرودشت، ایران

۳- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، ایران

مستقل مکاتبات: Dr.hemayatkhah@yahoo.com

چکیده

کافور، گیاهی متعلق به خانواده برگ بو است که احتمالاً در کنترل قوای جنسی مؤثر است. در این تحقیق اثر کافور بر اسپرماتوژنز مورد بررسی قرار گرفته است. پارامترهای بررسی شده شامل تعداد سلول‌های لایدیگ، اسپرم و غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH می‌باشد. حیوانات مورد آزمایش ۳۶ سر موش سوری نر بالغ با میانگین وزن 1 ± 34 گرم و سن ۱۰ هفته‌گی بودند. حیوانات به ۹ گروه ۴ تایی تقسیم شدند. در گروه کنترل هیچ تزریقی انجام نشد. به گروه‌های شش تیمار و پس از تیمار، روغن زیتون به عنوان حلال کافور و به گروه‌های تجربی ۱، ۲، ۳ و ۴ محلول کافور با دوزهای ۵، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد. گروه‌ها به دو صورت تیمار و پس از تیمار طبقه بندی شدند. گروه تیمار یک روز و گروه پس از تیمار یک هفته پس از آخرین روز تزریق تشریح شدند. تزریق به صورت درون صفاقی به مدت ۱۴ روز انجام شد. پس از اتمام تزریقات، موش‌ها توزین شدند. پس از تشریح، خونگیری و تهیه مقاطع بافتی انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های لایدیگ و اسپرم و غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH در گروه‌های تجربی در سطح $0.05 < P$ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است. بنابراین، با توجه به تغییرات هورمونی در گروه‌های تجربی که بیشتر در گروه تجربی متوسط دیده می‌شود می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کافور وابسته به دوز عمل کرده و احتمالاً باعث افزایش اسپرماتوژنز می‌گردد.

کلمات کلیدی: کافور، لایدیگ، تستوسترون، LH، موش سوری

مقدمه

لوله‌ای و نکروزیس بافت بینابینی در کلیه می‌شود [۵]. تزریق دوز بالای کافور در طی دوران جنینی و نوزادی، محور هیپوفیز - گناد را در موش نر مهار می‌کند [۳]. کافور بر سیستم باروری موش اثر می‌گذارد و باعث تغییرات معنی‌دار بر ساختار رحم می‌شود [۱۰]. محرک‌های جنسی بدست آمده برای بیضه مخرب است و اثر آن بر جنس مؤنث نیز موجب کاهش ترشح شیر می‌شود [۲۰]. کافور، یک اثر عمیق و وابسته به دوز روی آناتومی گنادها در هر دو جنس دارد و تکوین اووسیت و اسپرماتوسیت را مهار می‌کند [۸]. کافور ماده‌ای است که باعث سقط جنین می‌شود و به عنوان عامل ضد لانه-گزینی و جلوگیری از آبستنی است [۷]. بنابراین کافور می‌تواند در مراکز باروری و داروسازی و گیاه‌شناسی مفید

یکی از داروهای که مورد توجه بسیاری از محققین قرار دارد کافور است. کافور از تیره برگ بو است و در تمام قسمت‌های گیاه، اسانس سینامالدهید پراکنده است [۱]. اسپرماتوژنز در داخل لوله‌های منی‌ساز بیضه انجام می‌شود و در نتیجه‌ی تحریک توسط هورمون‌های گنادوتروپیک هیپوفیز قدامی شروع شده و در سرتاسر عمر ادامه دارد. عوامل هورمونی که اسپرماتوژنز را تحریک می‌کند عبارتند از تستوسترون، استروژن، LH، FSH و هورمون رشد. علاوه بر این عواملی مثل درجه حرارت محیط، تغذیه، سن و دارو نیز نقش دارند [۱۴]. تحقیقات گسترده‌ای روی این گیاه انجام شده است. ترکیبات عصاره دی کافور باعث افزایش فشار خون در افراد مسن می‌شود [۱۸]. کافور همچنین باعث خیز و بخش بخشی شدن



دریافت کردند. حیوانات به دو گروه تقسیم شدند. گروه تیمار که یک روز پس از آخرین روز تزریق تشریح شدند و گروه پس از تیمار که یک هفته دوره استراحت داشت و پس از ۲۱ روز تشریح شد. پس از تشریح و خونگیری، غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH به وسیله کیت های مخصوص هورمون به روش الیزا اندازه گیری شد. جهت شمارش سلول‌های لاییدیگ و اسپرم، بافت بیضه خارج و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی و توزین، در تثبیت کننده فرمالین قرار داده شد. پس از تهیه قالب‌های پارافینی، برش هایی به ضخامت ۵ میکرون از بافت با دستگاه میکروتوم تهیه شد و پس از رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین-ئوزین، بافت بیضه مورد بررسی قرار گرفتند. برای شمارش سلول‌ها، از هر بافت ۱۰ برش تهیه شد و از هر برش ۵ فیلد میکروسکوپی انتخاب شد و پس از شمارش سلول‌ها و میانگین گرفتن هر پارامتر، به عنوان عدد نهایی مربوط به پارامتر برای هر لام منظور گردید. داده‌ها با استفاده از برنامه SPSS و آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه و دانکن و T-test تفسیر شد. سطح معنی داری، $P < 0/05$ قرار داده شد. طبق روش دانکن، در هر گروه اگر یک حرف مشترک وجود داشته باشد تفاوت معنی داری وجود ندارد [۲].

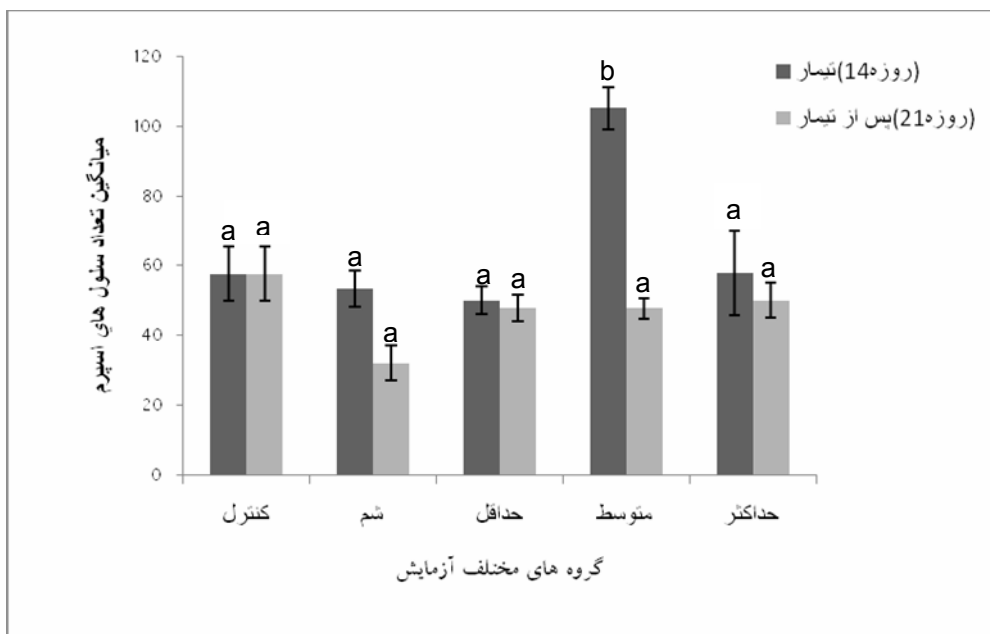
نتایج

نتایج حاصل از مقایسه میانگین تعداد سلول های اسپرم و لاییدیگ در گروه های تجربی با گروه های کنترل، افزایش معنی داری را در سطح $P < 0/05$ نشان می‌دهد (نمودارهای ۱ و ۲). همچنین مقایسه غلظت هورمون های LH و تستوسترون در گروه های تجربی در مقایسه با گروه های کنترل نشان دهنده افزایش معنی دار در سطح $P < 0/05$ است (نمودارهای ۳ و ۴).

واقع شود. در تحقیق حاضر، اثر کافور بر سلول‌های لاییدیگ و غلظت هورمون‌های LH و تستوسترون در موش سوری نر بالغ مورد بررسی قرار گرفته است.

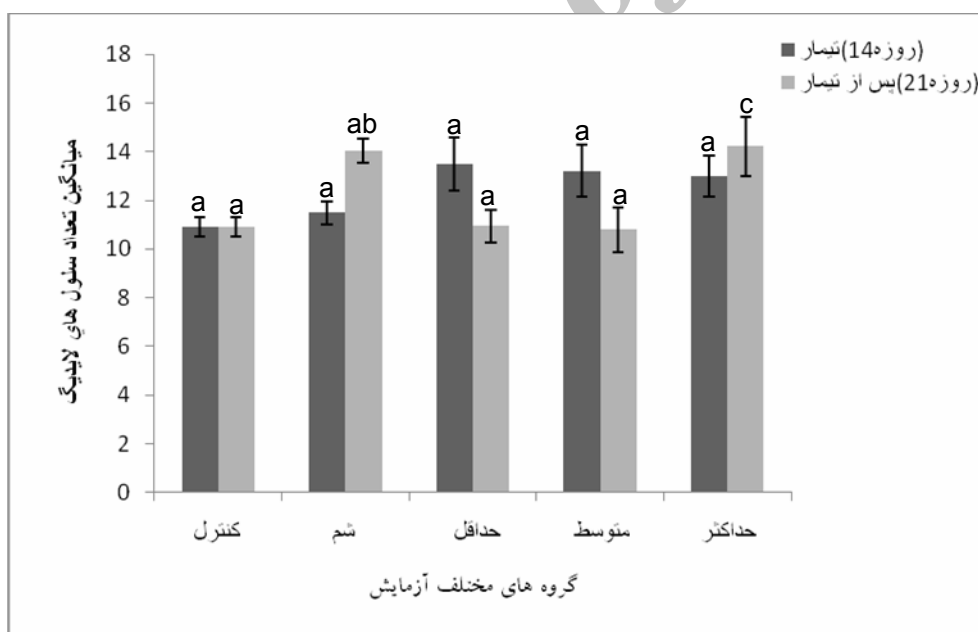
مواد و روش کار

حیوان مورد آزمایش در این تحقیق، ۳۶ سرموش سوری نر بالغ نژاد Balb/C در محدوده وزنی 1 ± 34 گرم و سن ۱۰ هفتگی بود که از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شد. درجه حرارت محیط در طول مدت آزمایش، 2 ± 23 درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی - تاریکی به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم شد. تغذیه حیوان توسط غذای مخصوص موش و آب آشامیدنی حیوانات آب لوله کشی شهر بود. حیوانات به مدت دو هفته جهت سازگاری با شرایط محیط در حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم نگهداری شد. پارامترهای مورد بررسی شامل شمارش تعداد سلول‌های اسپرم، لاییدیگ و غلظت هورمون های تستوسترون و LH بود. پودر کافور از یکی از مراکز معتبر فروش داروهای گیاهی خریداری شد. ۱۰ گرم از این پودر را برداشته و به آن ۱۰۰ سی‌سی هیدروالکل ۷۰٪ (اتانول) اضافه شد. سپس آن را در بن ماری بادرجه حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا تبخیر شود و رسوب تشکیل شود. از ۱۰ گرم پودر ناخالص حدود ۷/۱ گرم پودر خالص به دست آمد. پس از تعیین دوز کشنده کافور، پودر خالص کافور در روغن زیتون حل شد و غلظت های ۲۰، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم که زیر دوز کشنده بود تهیه شد. در گروه کنترل تزریقی انجام نشد. گروه شم، حلال کافور یعنی روغن زیتون دریافت کرد و گروه‌های تجربی ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دوزهای ۵، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارو دریافت کردند. تزریق، روزانه به روش درون صفاقی و به مقدار ۰/۰۲ سی‌سی انجام شد. همه حیوانات ۱۴ روز دارو



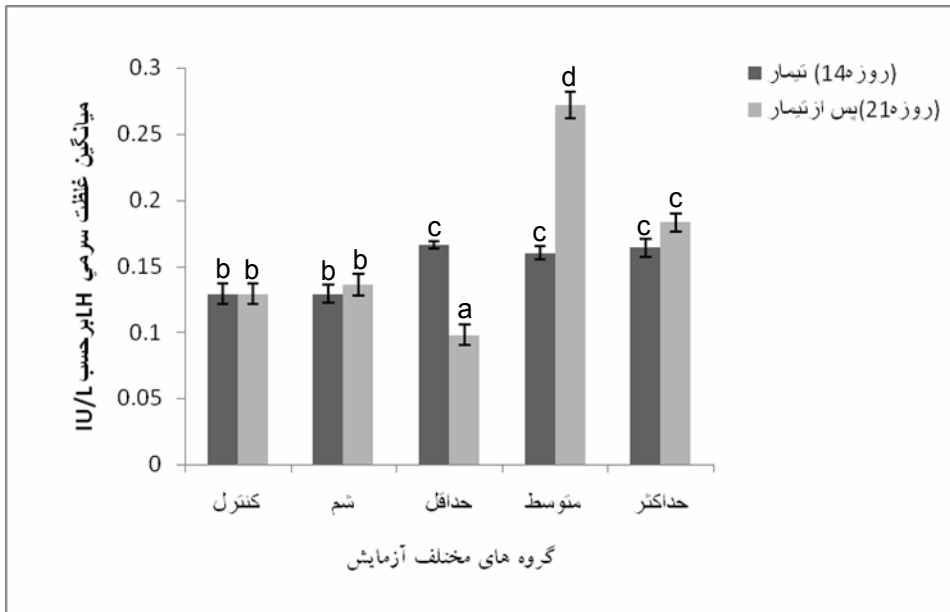
نمودار ۱- اثر کافور بر میانگین تعداد سلول‌های اسپرم

حرف b نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل در سطح $P < 0.05$ است.



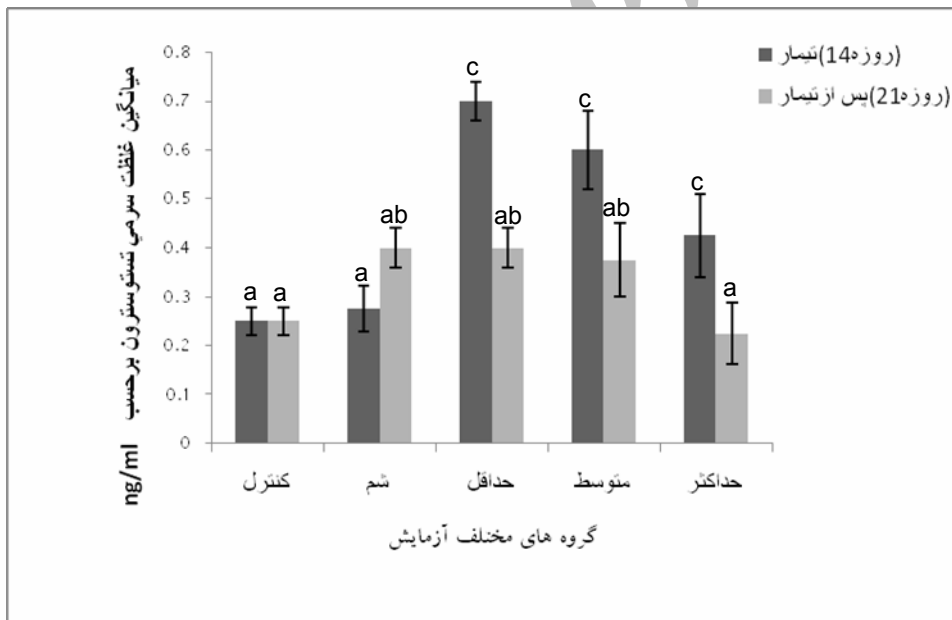
نمودار ۲- اثر کافور بر میانگین تعداد سلول‌های لایدیگ

حرف c نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل در سطح $P < 0.05$ است.



نمودار ۳- اثر کافور بر غلظت سرمی هورمون LH

حرف a و c و d نشان دهنده اختلاف معنی دار گروه های تجربی در مقایسه با گروه کنترل در سطح $P < 0.05$ است.



نمودار ۴- اثر کافور بر غلظت سرمی هورمون تستوسترون

حرف c نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل است.

بحث

کافور وابسته به دوز عمل کرده و بر روی گنادهای هر دو جنس اثر می‌گذارد [۱۱]. این ماده در دوز بسیار بالا باعث کاهش اسپرماتوژنز و در دوز پایین باعث افزایش آن می‌شود. افزایش میل جنسی توسط کافور ممکن است از طریق افزایش سنتز تستوسترون در موش‌های نر باشد. همچنین اثر کافور روی رفتار جنسی ممکن است از طریق تنظیم عصبی سمپاتیک اتفاق افتد [۷]. با کاهش دوز، امکان سمیت هم کاهش می‌یابد [۱۳]. البته در مورد غلظت هورمون تستوسترون مقادیر مورد بررسی در این تحقیق همگی نشان‌دهنده افزایش فرایند اسپرماتوژنز نسبت به گروه کنترل هستند ولی در مقایسه سه دوز مورد بررسی با همدیگر اختلافات کاهش غلظت هورمون تستوسترون دیده می‌شود که با یکدیگر معنی دار نیستند و این احتمال وجود دارد که اگر دوز بالاتری مورد بررسی قرار گیرد می‌تواند روند کاهشی را در فرایند اسپرماتوژنز به دنبال داشته باشد که این حالت در رابطه با تستوسترون مشخص تر است (نمودار ۴).

بنابراین با توجه به افزایش غلظت هورمون تستوسترون به خصوص در دوزهای حداقل و متوسط نسبت به گروه کنترل و همچنین افزایش معنی دار غلظت هورمون LH و نقش این هورمون‌ها در فرایند تقسیم سلول‌های جنسی و افزایش تعداد سلول‌های لایدیگ، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کافور احتمالاً بر روند اسپرماتوژنز و میزان باروری مؤثر است. به هر حال بهتر است تحقیقات گسترده‌تری در این زمینه انجام شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی و کارکنان آزمایشگاه فیزیولوژی و جنین‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم که در اجرای این کار تحقیقاتی همکاری داشته‌اند تقدیر و سپاسگزاری می‌شود.

نتایج تحقیق نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های لایدیگ و اسپرم و غلظت هورمون‌های تستوسترون و LH در گروه‌های تجربی در مقایسه با کنترل افزایش داشته است (نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴). یکی از ترکیبات کافور، سینامالدهید است که باعث افزایش ترشح نوراپی نفرین شده و نوراپی نفرین، ترشح اکسید نیتریک را تحریک می‌کند. نوراپی نفرین آزادسازی LH را به واسطه اکسید نیتریک زیاد می‌کند [۱۵ و ۱۷].

هورمون پرولاکتین توسط کافور مهار می‌شود. این هورمون وابسته به غلظت عمل می‌کند. افزایش پرولاکتین منجر به کاهش حساسیت گیرنده LH که همان سلول‌های لایدیگ است شده و در نتیجه ترشح تستوسترون کاهش می‌یابد. از آنجا که کافور باعث مهار پرولاکتین می‌شود در نتیجه حساسیت گیرنده LH افزایش یافته و ترشح تستوسترون بالا می‌رود [۶ و ۹].

همچنین مهار پرولاکتین باعث توقف تولید اکسید نیتریک می‌شود. در نتیجه روی هیپوتالاموس اثر مهاری گذاشته و ترشح GnRH هم مهار می‌شود. به منظور جبران این کمبود، مکانیسم فیدبک منفی راه اندازی شده و کلسترول از بافت بیضه نفوذ کرده و به پرگنولون تبدیل می‌شود و استروئیدوژنز رخ می‌دهد [۱۶]. تستوسترون، عامل بقای اسپرماتوژنز و به عنوان مهم‌ترین هورمون‌های مؤثر در روند اسپرماتوژنز است [۱۲ و ۱۹].

سلول‌های لایدیگ انسان و سلول‌های سرتولی تولیدکننده اینترلوکین ۱ و ۶ هستند. مشخص شده که اینترلوکین ۱ و ۶ توسط چندین دسته سلولی در بیضه موش تولید می‌شود و در کنترل پاراکرین عملکرد بیضه درگیر هستند. mRNA ی اینترلوکین ۱ و ۶ و پروتئین‌ها به وسیله سلول‌های لایدیگ و سرتولی رشد یافته تولید می‌شوند. باتوجه به واکنش سلول به سلول بین لایدیگ، سرتولی و تأثیر کافور بر سلول لایدیگ، اثر این ماده بر هیپوتالاموس و تغییر در مقدار ترشح FSH نیز محتمل است [۴].



of King Abdulaziz University-medical Sciences, 16(2).

11- Maria.EC., Osvaldo.JP., Romina.P., Berta.S., Maria.LD., Reynoso.R., (2008), Low dose 4-MBC effect on neuroendocrine regulation of reproductive axis in adult male rats. *Environmental Toxicology And Pharmacology*, 26(2):222-224.

12- Matzkin. H., Chen.J., Lewyshon.O., Ayalon.D and Braf.Z., (1992), Effects of long term treatment with finasteride(MK-906),5-alpha reductase inhibitor on circulating LH,FSH,prolactin and estradiol. *Horm Metab Res*, 24(10):498-9.

13-Nikravesh.MR and Jalali.M., (2004), The effect of camphor on the male mice reproductive system. *Urology*, 1(4):268-272.

14- Pareek.TK., Joshi.AR., Sanyal.A and Dighe RR., (2007), Insight into male germ cell apoptosis due to depletion of gonadotropins caused by GnRH antagonists. *Apoptosis*, 12(6):100-1085.

15- Parivzi.N and Ellendorff.F., (1982), Further evidence on dual effects of norepinephrine on LH secretion. *Neuro Endocrinolog*, 35(1):48-55.

16- Punta.KD., Charreau. EH.,(1996), Nitricoxide inhibits Leydig cell steridogenesis. *Endocrinology*, 133:5337-5343.

17- Sato.Y and Tsukanmamoto.T., (2000), Effects of nitric oxide stimulation on the brain. *Drugs Today*, 36(2-3):38.

18- Werner.NS., Duschek.S and Schandry.R., (2009), D-camphor-crataegus berry extract combination increases blood pressure and cognitive functioning in the elderly-a randomized,placebo controlled double blind study. *Phytomedicine*, 16(12):82-1077.

19- West.JB., (2001), Best and taylor's, physiological basic of medical practice. 12:1-550.

20-William.C., (1869), The Physiomedical Dispensatory. <http://medherb.com/>

منابع

- 1- زرگری، ع، ۱۳۷۶، گیاهان دارویی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، صفحه ۳۴۴-۳۳۵.
- 2- Basiri. A.(1999), Statistical designs in agricultural sciences. Shiraz University Press. 50-56.
- 3-Carou.ME., Szwarcfarb.B., Deguiz.ML., Reynoso.R., Carbone.S., Moguilevsky.JA., Scacchi,P and Ponzo.OJ., (2009), Impact of 4-methylbenzylidene-camphor (4-MBC)during embryonic and fetal development in the neuroendocrine regulation of testicular axis in prepubertal and peripubertal male rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 117(9):449:454.
- 4-Cudicini.C., Lejeune.H., Gomes.E., Bosmans.E., Ballet.F., Saez.J and Jegou.B., (1997), Human Leydig cells and sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6.*The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(5):1426-1433.
- 5-Eweka.AO., Adjene.JO and Enaibe.BU., (2008), Histological studies of the teratogenic effects of camphor on the developing kidney of the wistar ret. *Annals of Biomedical Sciences*, 7(1&2).
- 6- Hussein.MO and Zipfw.B., (1987), Characteristics of prolactin modulate induction of LH,hCG receptor. *J Androl*, 8(6):388-92.
- 7-Jamshidzadeh.A., Sajedianfard.J., Nekoeian.A., Tavakoli.F and Omrani.GH., (2006), Effects of camphor on sexual behaviors in male rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(4):209-214.
- 8-Kunz.PY., Gries.T and Fent.K., (2006), The uv filter 3-benzylidene camphor adversely affects reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicology Sciences*, 93(2): 311-321.
- 9-Lergo.MB., Bouhdibo.MP and Peyrat. JS., (1989), Peripheral effect of prolactin in reproduction function. *J Gynecol Obstet Boil Reprod(Paris)*, 18(1):39-45.
- 10- Linjawi.SA., (2009), Effect of camphor on uterus histology of pregnant rats. *The Journal*