

تأثیر عصاره آبی گیاه بومادران بر روی اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی رت بالغ تحت

درمان با داروی سیکلوسپورین A

زهرا اکبری زاده^۱، غلامرضا نجفی^۲، فرح فرخی^۳

۱- کارشناس ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، (نویسنده مسئول)، زابل، ایران

۲- استادیار آناتومی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده:

مقدمه: سیکلوسپورین A یک داروی تضعیف کننده سیستم ایمنی بوده که در پیوند اعضا جهت جلوگیری از پس زدن عضو پیوندی بطور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. سیکلوسپورین A باعث کاهش فعالیت سیستم ایمنی بدن با دخالت بر فعالیت و رشد سلولهای T می گردد. بومادران بعنوان یک گیاه دارویی بسیار گسترده بعلت دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی و ضد- التهابی مورد توجه می باشد. هدف ما در این مطالعه ارزیابی اثر محافظتی عصاره آبی بومادران بر روی پارامترهای اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی بر علیه اثرات سمی داروی سیکلوسپورین بر روی جنین رت است.

روش کار: در این مطالعه ۴۴ رت نژاد ویستار به چهار گروه کنترل، سیکلوسپورین (۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بومادران (۱۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و سیکلوسپورین- بومادران (۳۰ - ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) تقسیم شدند. در روزهای ۲۱ و ۴۵ خصوصیات اسپرم و میزان باروری آزمایشگاهی (IVF) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در گروه سیکلوسپورین اختلاف معنی داری ($P < 0.05$) در کاهش تعداد اسپرم، قابلیت زندهمانی اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی مشاهده گردید. در گروه بومادران به همراه دارو افزایش قابل توجهی در میزان پارامترهای بالایی مشاهده گردید. **نتیجه گیری:** یافته های ما آشکار کرد که عصاره آبی بومادران ممکن است تا حدودی اثر محافظتی بر علیه سمیت سیکلوسپورین بر روی جنین داشته باشد.

کلید واژه ها: اسپرم، بومادران، سیکلوسپورین، رت نر، توان باروری آزمایشگاهی.



مقدمه

به مقدار زیاد و مدت طولانی در بیماران پیوند اعضا (از جمله پیوند کلیه، کبد، و پانکراس) و بیماریهای خود ایمن و بیماریهای دیگر مثل سندرم نفروتیک مورد استفاده قرار می گیرند (۲، ۳، ۴). با مصرف مزمن داروهای مهار کننده سیستم ایمنی شانس ابتلا به سرطان در طولانی مدت افزایش پیدا می کند (۵). مطالعات نشان داده که دوز بالای سیکلوسپورین A در رت باعث کاهش در میزان هورمون تستوسترون می گردد که علت آن کاهش در تعداد گیرنده های LH و یا کاهش در سیتوکروم P450 وابسته به آنزیم هیدروکسیلاز در سلولهای لیدیک می باشد (۶ و ۷).

سیکلوسپورین A یک پلی پپتید قارچی است که اولین بار در سال ۱۹۷۶ بعنوان یک آنتی بیوتیک برای درمان برخی از بیماری های عفونی و در بیماران پیوندی جهت عدم پس زدن عضو پیوندی معرفی گردید (۱). سیکلوسپورین با دارا بودن عوارض جانبی نسبتاً کمتر و فواید زیاد نسبت به سایر داروها دارای مصرف و کاربرد زیاد بخصوص در پیوند اعضا می باشد. یکسری از داروها از جمله سیکلوسپورین، آزاتیوپرین، کورتیکواستروئید و تاکرولیموس داروهای مهار کننده سیستم ایمنی می باشند که

۴- گروه سیکلوسپورین-بومادران: در این گروه رت‌ها بطور همزمان سیکلوسپورین را با دوز ۳۰ میلی‌گرم و عصاره بومادران را با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن بصورت خوراکی و از طریق گاواژ بمدت ۴۵ روز دریافت نمودند. نمونه‌برداری از رت‌ها در روزهای ۲۵ و ۴۵ اخذ گردید. محیط کشت لازم جهت بررسی فاکتورهای مربوط به اسپرم، لقاح اووسیتها و رشد جنین‌ها محیط کشت اختصاصی برای جنین رت بوده که در آزمایشگاه تحقیقات جنین‌شناسی دانشکده علوم تهیه شد.

طرز تهیه محیط کشت اختصاصی برای جنین رت:

استوک A: کلرید سدیم ۶/۴۲ گرم، کلرید پتاسیم ۰/۲۳۹ گرم، گلوکز ۱/۳۵۲ گرم، پنی سیلین جی ۰/۰۷۵، استرپتومایسین ۰/۰۵۰ گرم لاکتات سدیم ۱/۹ میلی‌لیتر را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب سه بار تقطیر حل کرده و سپس با استفاده از فیلتر ۰/۲۰ فیلتر نموده و تحت عنوان استوک A در داخل یخچال ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

استوک B: برای تهیه آن کلرید کلسیم به میزان ۰/۲۹۴ گرم و کلرید منیزیم ۰/۱۰۲ گرم را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل نموده و بعد از فیلتر کردن در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

در داخل یک فلاسک محیط کشت ۱۰ میلی‌لیتر از استوک A و ۱۰ میلی‌لیتر از استوک B را ریخته و به آن ۰/۲۱۰ گرم بیکربنات سدیم، ۰/۰۰۵۵ گرم پیرووات سدیم، ۰/۰۱۴۶ گرم گلوتامین آل، ۲ میلی‌لیتر اسیدهای آمینه ضروری و ۱ میلی‌لیتر اسیدهای آمینه غیر ضروری اضافه نموده سپس حجم آن را با استفاده از آب سه بار تقطیر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و محیط را فیلتر و مورد استفاده قرار دادیم.

تهیه عصاره آبی بومادران: گل‌های این گیاه را بعد از خشک شدن آسیاب کرده و در داخل بشری حاوی آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد (۱۰ گرم پودر بومادران در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) به مدت ۳۰ دقیقه و سه مرتبه (بر روی هیتر مغناطیستی) قرار داده شد. بعد از فیلتر کردن مایع بدست آمده را در شرایط خلا با دمای ۵۶ درجه سانتیگراد تغلیظ

بومادران از تیره آفتابگردان بوده که ۷ گونه آن در کشور ما در استان گیلان، گلستان، آذربایجان و خراسان وجود دارد (۱۰،۹۸). سابقه درمان بیماریها با گیاهان دارویی به گذشته‌های خیلی دور برمی‌گردد. گیاه بومادران به سبب دارا بودن فلاونوئیدهایی نظیر آپیزین، لوتئولین و روتین و ترکیبات فنلی واجد خواص آنتی‌اکسیدانی بالقوه می‌باشند (۱۱). فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد نتیجه عملکرد ترکیبات فنلی و فلاونوئیدهای موجود در این گیاه می‌باشد (۱۳ و ۱۲). با توجه به این که اغلب مصرف کنندگان این دارو افراد جوان و در سنین باروری می‌باشند لذا تحقیق بیشتر در مورد عوارض جانبی این دارو بخصوص بر روی توان باروری ضرورت دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی عصاره گیاه بومادران بر روی پارامترهای کمی و کیفی اسپرم و توان باروری آزمایشگاهی (IVF) در رت‌های تحت تیمار با داروی سیکلوسپورین می‌باشد.

روش پژوهش:

در این تحقیق تعداد ۴۴ رت نر بالغ با وزن متوسط ± 15 گرم در خانه حیوانات آزمایشگاهی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ± 3 ۲۲ نگهداری شدند و غذای آنها ترکیبی از گندم، ذرت و پلت بوده و آب بصورت آزاد در اختیار آنها بود. در این مطالعه رت‌ها بطور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

- ۱- گروه کنترل: در این گروه رت‌ها هیچ دارو و عصاره‌ای دریافت نکردند و آب و غذای معمولی استفاده کردند.
- ۲- گروه سیکلوسپورین: در این گروه رت‌ها داروی سیکلوسپورین را با دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بصورت خوراکی از طریق گاواژ بمدت ۴۵ روز دریافت کردند.
- ۳- گروه بومادران: در این گروه رت‌ها عصاره بومادران را با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن بصورت خوراکی و از طریق گاواژ بمدت ۴۵ روز دریافت کردند.



اسپرمهای موجود در محیط کشت اسپرم تهیه کرده و بعد از خشک شدن در آزمایشگاه، توسط محلول فیکساتیو گلو تار آلدئید ۳ درصد به مدت نیم ساعت فیکس شدند سپس اسپرمها توسط رنگ آنیلین بلو ۵ درصد (با استفاده از اسید استیک ۴ درصد) به مدت ۵ الی ۸ دقیقه رنگ آمیزی شده و درصد اسپرمهای بالغ با سر بیرنگ و اسپرمهای نابالغ با سر آبی رنگ با استفاده از میکروسکوپ نوری بدست آمدند (۱۵).

ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرمها: جهت بررسی کیفیت کروماتین اسپرمها از رنگ آمیزی آکریدین اورانج استفاده شد که این رنگ آمیزی برای تفريق DNA سالم و دو رشته ای از DNA دنا توره شده تک رشتهای مورد استفاده قرار میگیرد. اسپرمها با DNA سالم بعد از رنگ آمیزی در زیر میکروسکوپ فلورسنت، به رنگ سبز دیده میشوند در حالیکه اسپرمها با DNA آسیب دیده به رنگ نارنجی تا قرمز دیده میشوند. اسپرمها با استفاده از الکل متانول فیکس شدند سپس لامها با استفاده از آکریدین اورانج رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۶).

ارزیابی رشد جنینها و بررسی توان باروری آزمایشگاهی:

تخمک گیری از رتهای ماده: برای بدست آوردن تخمک جهت انجام توان باروری آزمایشگاهی ابتدا به رتهای ماده نابالغ با وزن متوسط 160 ± 10 گرم، ۳۰ واحد بین المللی هورمون گنادوتروپین سرم مادیا ن آستن بصورت داخل صفاقی و بعد از گذشت ۵۶ ساعت از تزریق هورمون PMSG، هورمون گنادوتروپین کوریون انسان به میزان ۲۵ واحد بین المللی بصورت داخل صفاقی تزریق شد. ۱۶ ساعت بعد از تزریق HCG تخمک گیری از رتها به روش دیسکت کردن (بدین صورت که با استفاده از یک سرنگ انسولینی با سر سوزن قیج ۲۷ ناحیه آمپول را پاره کرده تا اووسیتها وارد محیط کشت شوند) از ناحیه آمپول اویداکت صورت گرفت. تخمکهای بدست آمده در داخل یک قطره لقا ح ۵۰۰ میکرو لیتری گذاشته می شد. سپس یک میلیون اسپرم قبلاً به توانایی رسیده به ازای هر میلی لیتر از محیط

داده تا به $1/12$ حجم اولیه برسد عصاره بدست آمده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتیگراد نگه داشته شده و در مواقع مصرف با آب مقطر رقیق کرده و مورد استفاده قرار میگرفت (۱۴).

اخذ اسپرم از دم اپیدیدیم: رتها توسط جابجایی مهره های گردنی آسان کشی شده و بعد از باز کردن محوطه شکمی آنها دم اپیدیدیم را برداشته و در داخل یک میلی لیتر محیط کشت اختصاصی رت حاوی ۴ میلی گرم آلبومین سرم گاوی به ازای هر میلی لیتر محیط کشت در داخل انکوباتور CO_2 ۵ درصد با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته تا اسپرمهای موجود در دم اپیدیدیم وارد محیط کشت شوند. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه دم اپیدیدیم را از محیط کشت خارج کرده و از اسپرمهای موجود در محیط کشت برای ارزیابی پارامترهای اسپرمی استفاده گردید. همچنین محیط کشت حاوی اسپرم بمدت ۵ ساعت در داخل انکوباتور مذکور جهت ظرفیت یابی اسپرمها و اضافه کردن اسپرم به قطره لقا ح حاوی اووسیت های اخذ شده قرار داده شد.

ارزیابی تعداد کل اسپرم در هر میلی لیتر محیط کشت: ابتدا

رقت ۱ به ۲۰ از اسپرمهای بدست آمده از دم اپیدیدیم (۵ میکرو لیتر اسپرم موجود در محیط کشت با ۹۵ میکرو لیتر رقیق کننده ساخته می شود) تهیه کرده سپس ۱۰ میکرو لیتر از نمونه رقیق شده به چامپر شمارشگر هموسیتومتر منتقل گردید.

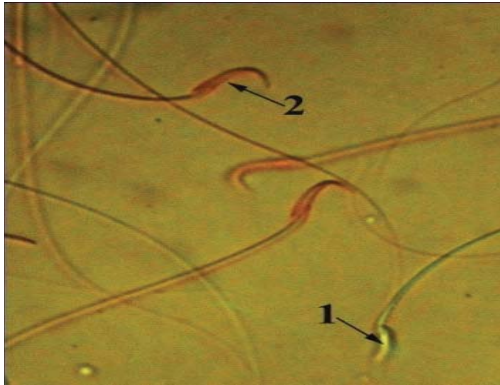
تعداد اسپرم در هر میلی لیتر از محیط کشت = عکس رقت $50000 \times$ تعداد اسپرم در ۵ خانه

ارزیابی زنده بودن اسپرمها: از رنگ آمیزی ائوزین-

نگروزین جهت بررسی اسپرمهای زنده و مرده استفاده شد. که در این رنگ آمیزی اسپرمهای زنده رنگ ائوزین را به خود نگرفته در نتیجه سر اسپرم بیرنگ مشاهده میگردد اما اسپرمهای مرده رنگ ائوزین را به خود گرفته و سر این اسپرمها به رنگ قرمز دیده میشوند.

ارزیابی درصد اسپرمهای نابالغ: از رنگ آمیزی آنیلین بلو برای بررسی اسپرمهای بالغ و نابالغ استفاده گردید. از

تعداد اسپرمهای زنده مشاهده میگردد ولی درصد اسپرمهای زنده در گروه سیکلوسپورین- بوماردان پایین تر از گروه کنترل و گروه بوماردان بود و اختلاف معنی داری را با این گروهها نشان میدهد. میانگین درصد زنده ماندن اسپرمها در گروههای مختلف در جدول ۱ آورده شده است.



تصویر ۱: در این تصویر یک اسپرم زنده با سر روشن (۱) و چندین اسپرم مرده با سر قرمز رنگ (۲) در گروه سیکلوسپورین روز ۲۵ دیده میشود (رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین، درشت نمایی $\times 1000$)

ارزیابی درصد اسپرمهای نابالغ:

در رنگ آمیزی آنیلین بلو مشخص گردید که درصد اسپرمهای نابالغ در گروه سیکلوسپورین- بوماردان افزایش یافته است و اختلاف معنی داری با گروه کنترل، بوماردان و گروه سیکلوسپورین دارد. میانگین درصد اسپرمهای نابالغ در گروههای مختلف در جدول ۱ آورده شده است.



تصویر ۲: در این شکل اسپرمهای بالغ با سر بیرنگ و روشن (۱) و اسپرمهای نابالغ با سر آبی رنگ (۲) در گروه سیکلوسپورین روز ۲۵ دیده میشود (رنگ آمیزی آنیلین بلو، درشت نمایی $\times 400$)

کشت (قطره لقاح) برای باروری اووسیتها به قطره لقاح اضافه کرده و بعد از گذشت ۹ ساعت و با مشاهده دو پیش هسته درصد لقاح بدست آمد. همچنین درصد تشکیل جنینهای دو سلولی بعد از گذشت ۲۴ ساعت و بلاستوسیستها در ۴ الی ۵ روز بعد از لقاح مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

آنالیز آماری:

داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و آزمون آنوای یک طرفه مورد تحلیل و تجزیه قرار گرفتند.

یافته ها:

تعداد اسپرم در گروههای مورد مطالعه: در این مطالعه مشخص گردید که در گروه سیکلوسپورین در روز ۲۵ و ۴۵ کاهش در تعداد اسپرمها دیده میشود که این کاهش در تعداد اسپرمها در این گروه اختلاف معنی داری ($P \leq 0.05$) با گروه کنترل، بوماردان و همچنین گروه سیکلوسپورین- بوماردان دارد. در گروه سیکلوسپورین- بوماردان تعداد اسپرمها افزایش ولی این افزایش در روز ۲۵ با گروه کنترل و بوماردان اختلاف معنی داری را نشان میدهد اما تعداد اسپرمها در گروه سیکلوسپورین- بوماردان روز ۴۵ هیچ اختلاف معنی داری با گروههای کنترل و بوماردان ندارد. در گروه سیکلوسپورین روز ۴۵ کاهش در تعداد اسپرمها اختلاف معنی داری با روز ۲۵ گروه سیکلوسپورین دارد. میانگین تعداد اسپرمها در گروههای مختلف در جدول ۱ آمده است.

ارزیابی قابلیت زنده ماندن اسپرمها:

با توجه به جدول شماره ۱ درصد اسپرمهای زنده در گروه سیکلوسپورین در روزهای ۲۵ و ۴۵ کاهش یافته و اختلاف معنی داری با گروه کنترل، بوماردان دارد و این نشان میدهد که این دارو میتواند باعث افزایش اسپرمهای مرده گردد ولی در گروه سیکلوسپورین و بوماردان که رتھا همزمان با دارو عصاره نیز دریافت کرده بودند افزایش در



اختلاف معنی‌داری در درصد بلاستوسیتها در روز ۴۵ با گروه کنترل و بومادران دارد. (تصویر ۳)



تصویر ۳: در گروه سیکلوسپورین روز ۴۵ جنین‌ها در مراحل مختلف رشد دیده می‌شوند که دو جنین در مرحله بلاستوسیت (۱)، یک اووسیت نابارور (۲)، دو جنین که در مرحله دو سلولی متوقف شده (۳ و ۴) که یک بلاستومر آنها لیز و فراگشته شده است، یک جنین که در مرحله هشت سلولی متوقف شده (۴) که در تعدادی از بلاستومرهای آن فراگشته شدن وجود دارد و جنینی که در مرحله چهار سلولی متوقف شده است (۵) (میکروسکوپ اینورت، درشت‌نمایی $\times 100$)

بحث و نتیجه‌گیری:

تقریباً ۲۰ درصد زوجهای جوان از ناباروری در طول زندگی خود رنج می‌برند که ۵۰ درصد عوامل ناباروری مربوط به مردان میباشد که عوامل مختلفی در این مردان نابارور دخیل است (۱۸) که اکثریت عوامل مربوط به کیفیت اسپرم میباشد. عوامل بسیاری باعث ناباروری در مردان و زنان میشود که این عوامل میتواند فاکتورهای محیطی از قبیل مواد شیمیایی و دارویی باشد که در طول زندگی به اجبار این مواد وارد بدن انسان میگردد (۱۹). بسیاری از سموم کشاورزی از جمله سم دیازینون (۲۰) و ایمیدوکلوپراید (۲۱) که برای از بین بردن آفات کشاورزی در مزارع استفاده میشوند باعث ایجاد یکسری تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه میگردند، از جمله آتروفی بافت بیضه، ادم بافت بینابینی بیضه، کاهش سلولهای لیدیک (که ترشح کننده هورمون تستوسترون میباشد)، افزایش سلولهای ایمنی در بافت بینابینی بیضه و کاهش ضریب تمایز در لوله‌های اسپرم‌ساز که همه این موارد میتواند نقش مهمی در ناباروری داشته باشد. همچنین مطالعات نشان

ارزیابی کیفیت DNA اسپرمها:

رنگ آمیزی آکریدین اورنج در این مطالعه نشان داد که در موشهای دریافت کننده داروی سیکلوسپورین تعداد اسپرمهای با سر نارنجی بویژه در روز ۴۵ نسبت به گروههای کنترل، بومادران و سیکلوسپورین- بومادران بیشتر بوده و اختلاف معنی‌داری با گروههای ذکر شده دارد. ولی در گروه بومادران درصد اسپرمها با DNA غیر طبیعی در حد گروه کنترل بود ولی در گروه سیکلوسپورین- بومادران کاهش معنی‌داری هم در روز ۲۵ و هم در روز ۴۵ در درصد اسپرمها با DNA ناسالم نسبت به گروه سیکلوسپورین دارد. میانگین درصد اسپرمهای با کروماتین آسیب دیده در گروههای مختلف در جدول ۱ آمده است.

ارزیابی درصد لقاح و رشد جنینها:

میزان درصد لقاح، جنین دوسلولی و بلاستوسیت در گروههای مختلف در جدول و نمودار شماره ۲ آورده شده است. نتایج حاصل نشان داد که در گروه سیکلوسپورین هم در روز ۲۵ و هم در روز ۴۵ درصد لقاح و یا زیگوتها، در مقایسه با گروه کنترل و بومادران کاهش یافته و اختلاف معنی‌داری با این گروهها دارد. در گروه سیکلوسپورین- بومادران درصد لقاح افزایش یافته ولی اختلاف معنی‌داری با گروه سیکلوسپورین ندارد. در ضمن اختلاف معنی‌داری مابین گروههای کنترل و بومادران با گروه سیکلوسپورین- بومادران وجود دارد. در بررسی جنینهای دو سلولی مشخص شد که در گروه سیکلوسپورین درصد جنینهای دو سلولی کاهش معنی‌داری با گروه کنترل و بومادران و گروه سیکلوسپورین- بومادران دارد. مشخص گردید که درصد بلاستوسیتها در گروه سیکلوسپورین کاهش یافته و این کاهش در روز ۴۵ اختلاف معنی‌داری با روز ۲۵ دارد، در ضمن در گروه سیکلوسپورین روزهای ۲۵ و ۴۵ کاهش در درصد بلاستوسیتها اختلاف معنی‌داری با گروههای کنترل و بومادران دارد. افزایش درصد بلاستوسیتها در گروه سیکلوسپورین- بومادران روز ۲۵ و ۴۵ اختلاف معنی‌داری با گروه سیکلوسپورین روز ۴۵ دارد همچنین

نتیجه درصد اسپرهای نابالغ افزایش پیدا میکند. در رنگ آمیزی آکریدین اورنج نیز مشخص شد که داروی سیکلوسپورین باعث افزایش DNA تک رشته ای دنا توره شده و یا DNA آسیب دیده میشود. مطالعات انجام گرفته نشان داده است که دم کرده گل‌های گونه های مختلف بومادران از اریتروسیتها و لوکوسیت‌های انسانی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن محافظت میکند (۲۸). یافته ها در امتداد تحقیقات پیشین قرار داشتند که نشان داده بودند که دم کرده های تهیه شده از این گیاه به سبب دارا بودن فلاونوئیدهایی نظیر آپیزین، لوتولین و روتین و ترکیبات فنلی واجد خواص آنتی اکسیدانی بالقوه میباشد (۳۰، ۲۹، ۲۸) در مطالعه ای که توسط والانز در سال ۱۹۹۴ انجام شد فلاونوئید گلیکوزیدها از عصاره آبی گیاه استخراج شده و نشان داد که این ماده خاصیت ضد آرتريت روماتوئید و نقرس حاد مفصلی را دارا است (۳۱). همچنین عصاره بومادران دارای یکسری مواد آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد درد و ضد تشنج میباشد، همچنین مشخص شده که گیاه بومادران بعلت دارا بودن منبع غنی تانن‌ها در بیماریهای قلبی و همچنین در بیماریهای مربوط به سیستم عصبی مورد استفاده قرار میگیرد (۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵). همچنین مشخص شده که بومادران اثرات محافظتی بر روی زخمهای معده ناشی از رادیکالهای آزاد بعلت دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی دارد (۳۶). همچنین نشان داده شده که بومادران در گلبولهای قرمز و سفید انسان بعلت دارا بودن ترکیبات فلاونوئیدی باعث کاهش اثرات مخرب رادیکالهای آزاد اکسیژن میگردد (۳۷). عصاره آبی بومادران در رت‌ها در دوز بالا میتواند اثرات سویی بر روی روند اسپرما توژنز و افزایش تولید اسپرهای غیر طبیعی داشته باشد، بنابراین در این مطالعه از حداقل دوز مورد استفاده در رفرنسها استفاده شده است (۳۸). در نهایت، با جمع بندی یافته های مطالعه حاضر میتوان چنین نتیجه گیری کرد که داروی سیکلوسپورین A منجر به آسیب‌های ساختاری و عملکردی وسیعی در بافت بیضه و روند تولید می شود از طریق برهم زدن تعادل

داده که برخی از داروها از جمله سیپرومترین (۲۲) و دیلتیازیم (۲۳) که در انسان مورد استفاده قرار میگیرند میتوانند باعث ایجاد یکسری تغییرات پاتولوژیک در بافت بیضه از جمله آتروفی و ادم گردند در ضمن این داروها مشخص شده که میتوانند باعث کاهش در حرکت و تعداد اسپرهای و در نهایت باعث کاهش باروری گردد. مطالعات صورت گرفته بر روی افراد سیگاری که نیکوتین وارد بدنشان میگردد (۲۴) نشان داده که اسپرهای کاهش یافته و همچنین جنین های ناهنجار در این افراد بیشتر از افراد غیر سیگاری میباشد. مشخص شده که داروی سیکلوسپورین A در رت‌ها میتواند باعث کاهش قابل توجهی در تعداد اسپرهای گردد، در ضمن مشخص گردیده که این دارو تحرک اسپرهای را کاهش داده و در صورت توقف مصرف افزایش در تعداد اسپرهای و تحرک اسپرهای مشاهده میشود (۲۵). Seethalakshmi و Menon و همکارانش طی تحقیقاتی بر روی دستگاه تولید مثلی رت نر با دوزهای متفاوت سیکلوسپورین گزارش نمودند که با تأثیر سیکلوسپورین، بافت بیضه رت‌ها، تغییرات دژنراتیو را نشان داد و تعداد اسپرم و تحرک آنها کاهش می یابد و متعاقب آن در دوزهای بالای این دارو ناباروری دیده شد (۲۶). Seethalakshmi و Flores و همکارانش طی تحقیقاتی که بر روی بیضه رت انجام دادند و باروری و کارکرد بیضه را تحت تأثیر دوزهای بسیار پایین سیکلوسپورین بررسی کردند، اذعان داشتند که سیکلوسپورین باعث کاهش تعداد اسپرم و همچنین کاهش ۵۰ درصد تحرک آنها و حدود ۶۰ درصد ناباروری را می شود (۲۷). در این مطالعه نیز مشخص گردید که سیکلوسپورین بعنوان یک داروی انتخابی در بیماران پیوندی میتواند در رت‌ها باعث کاهش تعداد اسپرهای همچنین کاهش درصد اسپرم های زنده در موشهای تحت درمان با سیکلوسپورین گردد. همچنین در رنگ آمیزی آیلین بلو که در این مطالعه انجام شد نشان داد که سیکلوسپورین روند بلوغ اسپرهای را تحت تأثیر قرار داده و جایگزینی پروتئینهای هیستون با مشکل مواجه شده در



مثبت داشته و باعث افزایش درصد لقاح، جنینهای دو سلولی و جنینهای مرحله بلاستوسیست می گردد.

تشکر و قدردانی:

از کارشناس بخش بافت شناسی و جنین شناسی دانشکده علوم جناب آقای پورقدیم تشکر و قدردانی میشود.

اکسیداسیون- احیاء، موجب بروز استرسهای اکسیداتیو میگردد و سبب مسمومیت تولید مثلی دستگاه تولید مثلی نر میگردد، از طرف دیگر با تأثیر بر کیفیت اسپرم، میزان باروری و لقاح و تولید جنین را کاهش میدهد حال آنکه عصاره‌های آبی گیاه بومادران به سبب دارا بودن ویژگی- های آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه و در نتیجه قابلیت مهار رادیکالهای آزاد اکسیژن و نیتروژن باعث افزایش اسپرم، کاهش درصد اسپرمهای نابالغ و اسپرمها با کروماتین آسیب دیده می شود همچنین بر روی روند رشد جنینها اثر

References:

- 1- Rajfer J, Sikka SC, Lemmi C, Koyle MA. Cyclosporine inhibits testosterone biosynthesis in the rat testis. *Endocrinology*; 1987;121: 586-589.
- 2- Brown MW, Botton EM, More IA, Bradley JA. Immunological observations of rat fetal pancreas allografts transplanted into unmodified and cyclosporine treated recipients. *Transplantation*.; 1988: 46(6):800-806.
- 3-Little CW, Castillo B, Diloreto DA, Cox C, Wyatt J, Delcerro C. Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cell from degeneration in the Royal College of surgeons rat retina. *Investigate Ophthalmologist Visceral Science*.; 37(1):204-211.
- 4- Pietrzok B, Berndt M, Prokurat A, Marianowski L. Pregnancy and delivery after liver transplantation. *Animal Transplant*.;1996:1(4): 64-68.
- 5- Francine T, Myriam F, Fadi H, Michel DE, Sarkis M. malignancy after renal transplantation: incidence and rol of type ommunosuppressant. *Annals of surgical oncology*.;2001: 9(:785-788.
- 6- Seethalakshmi L, Flores C, Carboni AA, Bala R, Diamond DA, Menon M Cyclosporine: its effects on testicular function and fertility in the prepubertal rat. *Journal Andrology*.; 1990:(11): 17-24.
- 7- Krueger BA, Trakshel GM, Sluss PM, Maines MD .Cyclosporin-mediated depression of luteinizing hormone receptors and heme biosynthesis in rat testes: a possible mechanism for decrease in serum testosterone. *Endocrinology*.; 1991: (129): 2647-2654.
8. Mozaffarian V. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Mo'aser Publications.Iran.; 1996:11.(persion)
9. Zargari A. Medicinal Plant. Tehran University Publications. Iran.; 1995:106 - 17. (persion)
- 10- Konyalioglu S, Karamenderes C. Screening of total flavonoid, phenol contents and antioxidant capacities of Achillea L. species growing in Turkey. *Acta Pharmaceutica Turcica*.; 2004: 46(3): 163-170.
11. Giorgi A, Bombelli R, Luini A, et al. Antioxidant and cytoprotective properties of infusions from leaves and inflorescences of Achillea collina Becker ex Rchb. *Phytotherapy Research* .; 2009: 23 (4): 540-545.
12. Mazandarani M, Behmanesh B, Rezaei MB, et al. Ecological factors, chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from Achillea millefolium L. in the north of Iran. *Planta Med*.; 2007: 73: 880.(persion)
13. Karamenderes C, Apaydin S. Antispasmodic effect of Achillea nobilis L. subsp sipylea(O. Schwarz) Bassler on the rat isolated duodenum. *Journal Ethnopharmacology*.; 2003: 84: 178 - 9.

- 14- Ana Maria C, Cristiane HB, Cristina SF, Lia R, Renato SS, Jos'e Eduardo DS, Sonia MV, Maria CAM. Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology.*; 2006: (107): 277–284.
- 15- Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.*; 2001 : 18(4): 219-25. (persion)
- 16-Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J, et al. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *Journal Andrology.*; 2001:22(1):45-53.
- 17- Mark AS, Steven HW, Craig LF. The laboratory rat. Second Edition. Elsevier.; 2006: 166-190.
- 18- Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. effect of male age on semen quality and Fertility: a review of the literature. *Fertility Sterility.*; 2001: 75:237-248.
- 19- Schlegel PN, Chang TS, Marshall FF. Antibiotics: Potential hazards to male fertility. *Fertility Sterility.*; 1991: 55:235-242.
- 20-Najafi GH, Salami, S, Karimi A. The effect of Diazinon on testicular tissue in adult male rat: A Histopathological study. *Urmia Medical Journal.*; 2010: 20(4):313-319. (persion)
- 21- Najafi GH, Mazdak r, Hoshyar A, Simineh SH, Feyzi S. The effect of chronic Exposure with Imidocloprid insecticide on fertility in mature male rat.; 2010: 4(1): 9-16. (persion)
- 22- Yousef MI, Demerdash FM, Salhen KS. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on sperm quqlity and testosterone levels of rabbits. *Journal of Environmental science and Health.*; 2003: 38(4) : 463- 478.(persion)
- 23- Wood BL, Doncel Gf, Reddy PR, Sokal DC. Effect of diltiazim and methylen blue on human sperm motility, viability and cervical mucus penetration: Potential use as vas irrigants of the time of vasectomy. *Contraception.*; 2003: 67(3): 241-245.
- 24- Gamal H, EL-Sokkary, Salvatore C, Russel J. Effect of cfhronic nicotine administration on the rat lung and liver Beneficial role of melatonin. *Toxicology.*; 2007: 239(1-2):60-67.
- 25-Hisatomi A, Fujihira S, Fujimoto Y, Fujii T, Mine Y, Ohara K. Effect of Prograf (FK506) on spermatogenesis in rats. *Toxicology.*; 1996: 109(2-3):75-83.
- 26- Seethalakshmi, L., Menon, M., Malhotra, RK., Diamond, DA. Effect of cyclosporine A on male reproduction in rats. *J Urol.*;1987:138:991–5.
- 27- Seethalakshmi, L., Flores ,C., Khauli, RB., Diamond, DA.. Menon, M..Evaluation of the effect of experimental cyclosporine toxicity on male reproduction and renal function. Reversal by concomitant human chorionic gonadotropin administration *Transplantation.*;1990:49:17–9.
- 28- Konyalioglu, S., and Karamenderes, C. Screening of total flavonoid, phenol contents and antioxidant capacities of *Achillea* L. species growing in Turkey. *Acta Pharmaceutica Turcica.*;2004: 46 (3), 163-170
- 29- Kocevar, N., Glavac, I., Injac, R., and Kreft, S. Comparision of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.*;2008: 46, 609-614.
- 30- Giorgi, A., Bombelli, R., Luini, A., Speranz, G., Costentino, M., Lecchini, S., and Cocucci, M. Antioxidant and cytoprotective properties of infusions from leaves and inflorescences of *Achillea collina* Becker ex Rchb. *Phytotherapy Reseach.*;2009:23, 540-545.
- 31- Valant Vetschera KM. Therapeutic significance of C-Glycosylflavon acumulation in *Achillea*. *Science Phrmaceutia.*;1994:62:323-30
32. Mazandarani M, Behmanesh B, Rezaei MB, et al. Ecological factors, chemical composition and antibacterial activity of



the essential oil from *Achillea millefolium* L. in the north of Iran. *Planta Medica*.; 2007: 73: 880.(persion)

33. Karabay-Yavasoglu NU, Karamenderes C, Baykan S, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities and acute toxicity of *Achillea nobilis* subsp *neilreichii* extract in mice and rats. *Pharmaceutical Biology*.; 2007: 45: 162 - 8.

34. Vitalini S, Fico G, Iorizzi M, et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Achillea macrophylla* L. and *Achillea stricta* Schleicher from Valsesia . *Planta Medica*.; 2007: 73: 998.

35. Karamenderes C, Apaydin S. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp *sipylea* (O.Schwarz) Bassler on the rat isolated duodenum. *Journal Ethnopharmacology*.; 2003: 84: 178 - 9.

36. Potrich FB, Allemand A, da Silva LM, et al. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.:Involvement of the antioxidant system. *Journal Ethnopharmacology*.; 2010: 130 (1): 85-92.

37. Konyalioglu S, Karamenderes C. The protective effects of *Achillea* L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidativedamage in human erythrocytes and leucocyte. *Journal Ethnopharmacology*.; 2005: 102 (2): 221-227.

38- Paulo R D, Ana M C, Anderson J.M , Samanta L A, Maria C.A . Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reproductive Toxicology* .; 2004: 18(6): 819-823.

جدول ۱: میانگین تعداد کل اسپرم در هر میلی لیتر محیط کشت (× ۱۰^۶)، درصد اسپرمهای زنده، درصد اسپرمهای نابالغ و درصد اسپرمها با

DNA آسیب دیده در گروههای مختلف مورد مطالعه (M±SD)

گروهها	کنترل	بومادران روز ۲۵	بومادران روز ۴۵	سیکلو سپورین روز ۲۵	سیکلو سپورین روز ۴۵	سیکلو سپورین - بومادران روز ۲۵	سیکلو سپورین - بومادران روز ۴۵
تعداد کل اسپرم (× 10 ⁶)	50/66 ± 2/51	48/33 ± 2/08	49/66 ± 5/50	33/66 ± 72/4*	20/33 ± 2/08*	34/33 ± 1/15*	43/66 ± 3/05
درصد اسپرمهای زنده	86/66 ± 3/05	84/33 ± 4/16	86/33 ± 2/08	79/33 ± 2/51*	69/33 ± 3/78 *	79/66 ± 3/05*	75/66 ± 2/51*
درصد اسپرمهای نابالغ	8/33 ± 1/52	7/66 ± 0/58	8/66 ± 1/52	13/66 ± 1/521	19/33 ± 1/52	11/66 ± 1/52*	10/33 ± 1/52*
درصد اسپرمها با DNA آسیب دیده	7/66 ± 1/52	7/33 ± 2/08	8/00 ± 1/00	15/33 ± 2/51	25/66 ± 2/51*	14/66 ± 2/51*	11/66 ± 1/53*

* سطح معنی داری

جدول ۲: میانگین درصد لقاح، درصد جنین های دو سلولی و درصد بلاستوسیتها در گروههای مختلف مورد مطالعه (M±SD).

گروهها	کنترل	بومادران روز ۲۵	بومادران روز ۴۵	سیکلو سپورین روز ۲۵	سیکلو سپورین روز ۴۵	سیکلو سپورین - بومادران روز ۲۵	سیکلو سپورین - بومادران روز ۴۵
درصد لقاح	77/56 ± 1/44	75/54 ± 1/92	76/85 ± 3/07	68/58 ± 2/76*	63/56 ± 5/48*	74/52 ± 1/68	75/55 ± 1/52
درصد جنین های دو سلولی	89/02 ± 4/60	86/65 ± 4/92	87/94 ± 7/64	81/27 1/04±*	55/30 ± 1/02*	84/95 4/53±	85/62 ± 2/12
درصد بلاستوسیتها	78/99 ± 1/33	76/61 ± 3/12	76/04 ± 5/52	60/97 ± 3/87*	23/33 ± 2/02*	66/34 ± 5/55*	61/7 ± 5/41*

* سطح معنی داری

Effect of aquatic extract of *Achillea millefolium* on sperm and in vitro fertilization in adult rats treated with Cyclosporine A

Akbarizadeh, Z.¹, Najafi, Gh.², Farokhi F.³

1- (**Corresponding Author**) Master of Histology and Embryology, Zabol, Iran.

2- Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary medicine, Urmia, Iran.

3- Department of Histology, Faculty of Science, Urmia, Iran.

Abstract:

Introduction: In this study we aimed to evaluate the protective effect of aqueous extract of *Achillea millefolium* on sperm parameters in vitro fertilization against cyclosporin A – induced embryo toxicity. Cyclosporin A is an immunosuppressant drug widely used in organ transplantation to prevent rejection. cyclosporin A reduces the activity of the immune system by interfering with the activity and growth of T cells. *Achillea millefolium*, a widely distributed medicinal plant, is highly regarded for its medicinal activities, including antioxidant and anti-inflammatory properties.

methods: In this study , 44 adult Wistar rats were divided into 4 groups as control , Cyclosporine (30 mg/kg) , *Achillea millefolium* (150 mg/kg) and Cyclosporine – *Achillea millefolium* group (30mg - 150 mg/kg). At 21 and 45 days Sperm characteristics and fertility Evaluated.

Result: The Cyclosporine treated group showed significant ($P<0.05$) decrease in the sperm count, sperm viability and in vitro fertilization. *Achillea millefolium* co-administration caused an increase in above-mentioned parameters.

Conclusion: These findings manifested that *Achillea millefolium* aqueous extract may be partially protective against Cyclosporine -induced embryo toxicity

Key words: Sperm, *Achillea Millefolium*, Cyclosporine, Rat, IVF.