بررسی اثر عصاره هیدروالکلی دانه کرچک بر اسپرماتوژنز در موش

رویا محمدی می‌آبادی[1*]، میترا حیدری نصرآبادی[2]، پروین خدارحمی[3]، سیده فاطمه سیادت[4]

۱- کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران
٤- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، آزاد راه تهران- ساوه، قبل از عوارضی دوم، شهر جدید پرند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی جانوری، تلفن و نمابر: ٦٥٢٢٧٤٥٦ (٠٢١)، ٠٩١٢٦٨٠٩٢١٦
پست الکترونیک: R_mohammadi_m@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲ **تاریخ تصویب:** ۹۲/۱۲/۲۱

چکیده

مقدمه: کرچک گیاهی است با خواص گوناگون که برخی مطالعات خواص ضدباروری آن را نشان داده‌اند.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره هیدروالکلی دانه کرچک بر روند اسپرماتوژنز و آسیب‌های آن در اسپرم است.

روش بررسی: ۳۵ سر موش نر به چهار گروه تجربی و یک گروه کنترل تقسیم شدند. گروه کنترل نرمال سالین و گروه‌های تجربی به ترتیب ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ٤٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره هیدروالکلی کرچک به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. ۱۰ روز پس از آخرین تزریق و بیهوشی حیوانات، اپیدیدیم و بیضه‌ها خارج شدند. خونگیری از قلب برای سنجش هورمون‌های جنسی انجام گرفت. پس از تهیه برش‌های عرضی از بیضه‌ها و رنگ آمیزی، شمارش رده‌های سلولی انجام شد. داده‌ها به روش آماری One - Way ANOVA و تست Tukey مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: وزن بیضه و اپیدیدیم راست، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوزوئید و لایدیگ در همه گروه‌های تجربی، همچنین قطر لایه ژرمینال در سه گروه ۲، ۳ و ٤ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشتند ($p<0/05$). در گروه تجربی ٤ میزان دناتوره شدن DNA افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت. میزان هورمون‌های جنسی و درصد اسپرم‌های زنده در گروه‌های تجربی ۳ و ٤ نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد.

نتیجه‌گیری: عصاره دانه کرچک باعث کاهش معنی‌دار در سلول‌های رده اسپرمی و میزان هورمون‌های جنسی می‌شود و میزان دناتوره شدن DNA ی اسپرمی در غلظت‌های بالاتر افزایش می‌یابد. در نتیجه این عصاره می‌تواند بر باروری تأثیر داشته و آنرا کاهش دهد.

گل‌واژگان: اسپرماتوژنز، باروری، عصاره دانه کرچک

www.SID.ir

مقدمه

انفجار جمعیت با امکانات موجود یکی از موانع اصلی در روند توسعه کشورها عنوان شده است. اگرچه از قرن گذشته تاکنون به خاطر گذشته و توسعه فراگیر تکنیک‌های ضدباروری، پیشرفت‌های چشمگیری نیز در زمینه کنترل جمعیت در جهان رخ داده است اما روش‌های جلوگیری از باروری در مردان همچنان محدودتر، گران‌تر و با عوارض جانبی زیادی همراه است. گیاه کرچک (Castor bean) با نام علمی *Ricinus communis* گیاهی است یک ساله و علفی از تیره فرفیون (Euphorbiaceae) که ساقه‌ای به ارتفاع ۲ متر دارد، ولی در آب و هوای گرم و مساعد ممکن است به صورت درختچه‌ای چند ساله به ارتفاع ٤ تا ٦ متر و گاهی بیشتر در آید. مصارف زیاد روغن دانه آن سبب شده که پرورش این گیاه در اغلب نواحی کره زمین عمومیت پیدا کند. میوه‌اش به صورت کپسولی یا پوشینه، ۳ لوبی، شکوفا، خاردار، مدور، مایل به سبز (بنفش مایل به قرمز) حاوی سه دانه بزرگ روغن‌دار، بیضی شکل، صاف و براق است که در یک طرف محدب و در طرف دیگر مسطح می‌باشد [۱]. رنگ دانه قرمز یا قهوه‌ای است و در یک انتها با نوعی بر آمدگی گوشتی پوشیده می‌شود. این میوه شبیه لوبیاست [۲]. کرچک یکی از قدیمی‌ترین گیاهانی است که در مناطق گرم به خاطر روغن دانه‌هایش کشت می‌شده است. در روغن کرچک اسیدهای چرب به میزان: ۸۷ درصد اسید ریسینولئیک، ۷ درصد اسید اولئیک، ۳ درصد اسید لینولئیک، ۲ درصد اسید پالمتیک و به مقدار جزئی اسید دی هیدروکسی استئاریک وجود دارد. اسید ریسین نولئیک، با فرمول شیمیایی $C_{18}H_{34}O_3$ و وزن مولکولی ۲۹۸/٤٥، به حالت مایع است. دانه کرچک علاوه‌بر مواد روغنی شامل: ۲/٤ تا ۳/۹ درصد مواد معدنی، ۱/۰٥ درصد اسیدمالیک، ۲/۱ تا ۲/۹ درصد از گلوسیدها، ٤/۲ درصد مواد محلول در الکل، ۱۹ تا ۲٦ درصد مواد ازته و ۲٥ درصد پروتئین و درصدی نیز سلولز است. روغن کرچک خاصیت ضدویروسی، ضدقارچی و ضدالتهابی دارد. همچنین مطالعات خواص ضددیابتیک، ضدباکتریایی آن را نشان داده‌اند [۲]. بررسی‌ها نشان داده است که عصاره الکلی ریشه کرچک کاهش شدید تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم، تغییر در سرعت حرکت، نحوه حرکت و مورفولوژی اسپرم و همچنین کاهش سطوح فروکتوز و تستوسترون در موش‌های صحرایی نر را سبب شده است [۳].

همچنین گفته شده است که اثر پیشگیری از بارداری با عوارض جانبی در عملکرد کلیه و کبد و نیز کاهش استروژن و پروژسترون در داوطلبان همراه بوده است [٤]. در مطالعه‌ای در دانشکده علوم دارویی نیجریه نشان داده شده که محلول عصاره متانولی کرچک در موش‌ها و خرگوش‌های ماده فعالیت ضدباروری و ضد لانه‌گزینی جنین دارد. در تخمدان موش‌های صحرایی جوان و همچنین در موش نابالغ، استفاده از غلظت‌های مؤثر عصاره افزایش وزن رحم را نشان داده است. علاوه‌بر این، عصاره موجب باز شدن زودرس واژن (Premature opening of the vagina)، افزایش تعداد سلول‌های اپیتلیال، سلول‌های سطحی شاخی (Comified cells) و کاهش تعداد لکوسیت‌ها در اسمیر واژن شده است [٥].

پژوهشی دیگر اثر عصاره دانه‌های کرچک در بافت بیضه و سنجش هورمون‌های جنسی در موش نر کوچک آزمایشگاهی در دو دوره متوالی چرخه اسپرماتوژنز (۳۸ و ۷۲ روزه) انجام دادند که نتایج به دست آمده از آن کاهش معنی‌دار در نسبت وزن بیضه به وزن بدن و سطح هورمون تستوسترون، در گروه تجربی را نشان داده است [٦].

همچنین اثر ضدباروری عصاره متانولی کرچک در غلظت‌های ۲۰ و ٤۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در رت‌های نر باعث کاهش در وزن اندام‌های تولید مثلی و سطح هورمون تستوسترون شده است و کاهش تعداد جنین‌ها در رت‌های ماده باردار را همراه داشته است [۷]. در این پژوهش علاوه‌بر سنجش‌های هورمونی و بررسی‌های بافت‌شناسی، بررسی‌های تکمیلی شامل شمارش اسپرمی اپیدیدیم، بررسی میزان آسیب رشته DNA اسپرمی و زیستایی اسپرم نیز انجام شد.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق ۳٥ عدد موش سویه‌ی NMRI از دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری شد و قبل از انجام آزمایش برای

Archive of SID
www.SID.ir

تطابق به مدت یک هفته در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند نگهداری شدند. موش‌های ۲۰ تا ۳۰ گرمی انتخاب شدند و به یک گروه کنترل و چهار گروه تجربی هر کدام شامل هفت سر موش تقسیم‌بندی شدند. موش‌های گروه کنترل توسط نرمال سالین و گروه‌های تجربی به ترتیب ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ٤٥ میلی‌گرم برکیلوگرم وزن بدن عصاره هیدروالکلی کرچک را (که تحت حرارت غیرمستقیم چراغ الکلی در سرم فیزیولوژی حل می‌شد) به مدت ۳۰ روز به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند.

تهیه عصاره

دانه‌های خشک شده بعد از تهیه، توسط یک آسیاب برقی به صورت پودر در آمدند. سپس داخل ظرف دکانتور ریخته شدند و حلال اتانول در حدی اضافه شد که روی دانه‌ها را پوشاند. بعد از ٢٤ ساعت شیر پرکولاتور را کم کم باز کرده تا حلال قطره قطره خارج شد، این روند ادامه پیدا کرد تا زمانی که محلول بی‌رنگی در ظرف دکانتور ماند. بعد از استخراج محلول را داخل بالن ریخته و بالن برای تغلیظ به دستگاه روتاری منتقل شد. عمل تقطیر در خلاء با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت؛ بعد از گذشت حدود چهار ساعت عمل تقطیر عصاره به دست آمد.

خونگیری و سنجش هورمون

۱۰ روز پس از آخرین تزریق موش‌ها با کلروفرم بیهوش و از قلب آنها خون‌گیری انجام شد. نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و تا زمان سنجش‌های هورمونی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور سنجش هورمون‌های LH و FSH و تستوسترون از کیت الایزای موش (Biotec Laboratories, Ltd; UK) در آزمایشگاه آذر استفاده و مقادیر هورمونی برای هر گروه ثبت شد.

هیستولوژی

بیضه‌ها و اپیدیدیم نیز پس از خارج شدن از بدن با سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند. ابعاد هر دو بیضه و اپی‌دیدیم با کولیس و وزن آنها نیز توسط ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ میلی‌گرم اندازه گرفته شد. سپس با سوزنی تونیکا آلبوژینه (به دلیل اینکه بیضه بافت همبند سخت به نام تونیکا آلبوژینه دارد که باعث می‌شود فیکساتیو به خوبی به داخل آن نفوذ نکند.) سوراخ شد و نمونه‌ها داخل فیکساتیو بوئن قرار گرفت. پس از انجام مراحل آماده‌سازی بافتی برش‌های عرضی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسلین – ائوزین با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

شمارش سلولی در برش‌های بافتی بیضه

قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و اندازه لایه ژرمینال توسط صفحه مدرج که بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ قرار می‌گرفت با عدسی ۱۰ میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شد. همچنین تعداد سلول‌های ژرمینال، تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید، اسپرم‌ها و سلول‌های لایدیگ، در هر لام در ۲۰ میدان دید مختلف با میکروسکوپ نوری شمارش شدند.

شمارش اسپرم اپیدیدیمی با لام‌نئوبار

پس از جدا کردن اپیدیدیم، در ۵ میلی‌لیتر محلول Ham's F10 به صورت قطعات کوچک برش زده شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با CO_2 ۵ درصد قرار داده شد تا اسپرم‌ها از توبول‌های اپیدیدیمی خارج شوند. با ملانژور گلبول‌های سفید سوسپانسیون اسپرمی کشیده و ۲۰ برابر رقیق شد، سپس یک قطره از سوسپانسیون حاصل را روی لام هماتوسیتومتر نئوبار قرار داده اسپرم‌ها در چهار خانه بزرگ اطراف لام شمارش شدند. سپس عدد حاصل در ۵۰/۰۰۰ ضرب و تعداد اسپرماتوزوئیدها در یک میلی‌لیتر محاسبه شد.

ارزیابی میزان آسیب رشته DNA با رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ

پس از تهیه اسمیر مراحل ثبوت، رنگ‌آمیزی و قرار دادن لامل بر روی لام‌ها انجام شد. شمارش با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت توسط فیلتر Reflector 450 nm، در هر اسلاید ۱۰۰ عدد اسپرم با استفاده از عدسی X100 بررسی و درصد اسپرم‌ها با DNA تک رشته‌ای دناتوره (قرمز رنگ)

Archive of SID
www.SID.ir

محاسبه شد. آکریدین اورانژ در واکنش با مولکول DNA دو رشته‌ای رنگ سبز درخشان، با مولکول DNA تک رشته‌ای رنگ قرمز و با DNA حد واسط (نیمه بالغ) رنگ زرد تا نارنجی ایجاد می‌کند.

زیستایی اسپرم‌ها (Viability)

از یک قطره از محلول سوسپانسیون اسپرمی تهیه شد سپس یک قطره رنگ (ائوزین – نگروزین) بر روی آن ریخته شد گسترش‌های تهیه شده با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ٤٠ بررسی شدند. در هر نمونه ١٠٠ اسپرم شمارش و درصد اسپرم‌های زنده مشخص شد. تعداد اسپرم‌های زنده (سربی رنگ) نسبت به کل تعداد اسپرماتوزوئیدهای موجود در میدان دید میکروسکوپ محاسبه شد.

آنالیز آماری

کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری از روش آماری ANOVA و تست Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

در بررسی‌های مورفومتریک استفاده از عصاره در هر چهار غلظت ٢٥، ٣٠، ٣٥ و ٤٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در وزن بیضه و اپیدیدیم راست کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p<0/05$) (جدول شماره ١). اما کاهش معنی‌داری در ابعاد بیضه‌ها دیده نشد، در بررسی‌های هیستولوژیک قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، گروه تجربی چهار نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت. اما قطر لایه ژرمینال در غلظت‌های ٤٥، ٣٥، ٣٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم از وزن بدن کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داده است (جدول شماره ١). میزان آسیب ماده ژنتیکی اسپرم در گروه تجربی سه ٣٥ درصد، گروه تجربی چهار ٤٥ درصد و گروه نرمال ٢٠ درصد بود. بنابراین میزان دناتوره شدن ماده ژنتیکی اسپرم‌ها در گروه‌های تجربی سه و چهار نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$). همچنین درصد اسپرم‌های زنده در گروه تجربی سه ١٥ درصد و گروه تجربی چهار ١٠ درصد و گروه کنترل ٧٥ درصد بود. بنابراین زیستایی اسپرم‌ها در گروه‌های تجربی سه و چهار نسبت به

جدول شماره ١- نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های مورفومتریک و هیستولوژیک در گروه کنترل و گروه‌های تجربی نتایج به صورت Mean ± SD بیان شده است

گروه‌ها	قطر لوله‌های اسپرم‌ساز	قطر لایه ژرمینال	وزن اپیدیدیم چپ	وزن اپیدیدیم راست	وزن بیضه چپ	وزن بیضه راست
کنترل	٨٦/٣ ± ٧/١٣	٢٧/٢٦ ± ٢/٦٠	٠/٢٦ ± ٠/٠٧	٠/٢٢ ± ٠/٠٤	٠/١٤ ± ٠/٠٢	٠/١٤ ± ١/١٢
تجربی ١	٨٣/٧٥ ± ١١/٢٠	٢٣/٠١ ± ٦/٢٨	٠/١٤ ± ٠/٢٠	٠/٠٦ ± ٠/٠٢*	٠/١٤ ± ٠/٠٢	٠/١١ ± ٠/٠١*
تجربی ٢	٧٩/٥٤ ± ٤/٣٢	١٩/٨٥ ± ١/١٩*	٠/١٣ ± ٠/٠٠	٠/٠٤ ± ٠/٠٠*	٠/١٣ ± ٠/٠٠	٠/١١ ± ٠/٠١*
تجربی ٣	٧٨ ± ٦/٣١	١٩/٦٤ ± ٠/٨٥*	٠/١٣ ± ٠/٠٠	٠/٠٤ ± ٠/٠٠*	٠/١٣ ± ٠/٠٠	٠/١١ ± ٠/٠٠*
تجربی ٤	٦٩/٦ ± ١٠/٢٥*	١٧/٥٥ ± ١/٥٩*	٠/١٢ ± ٠/٠٠	٠/٠٣ ± ٠/٠٠*	٠/١٢ ± ٠/٠٠	٠/١٠ ± ٠/٠١*

علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p<0/05$ بین گروه‌های تجربی و گروه کنترل می‌باشد.

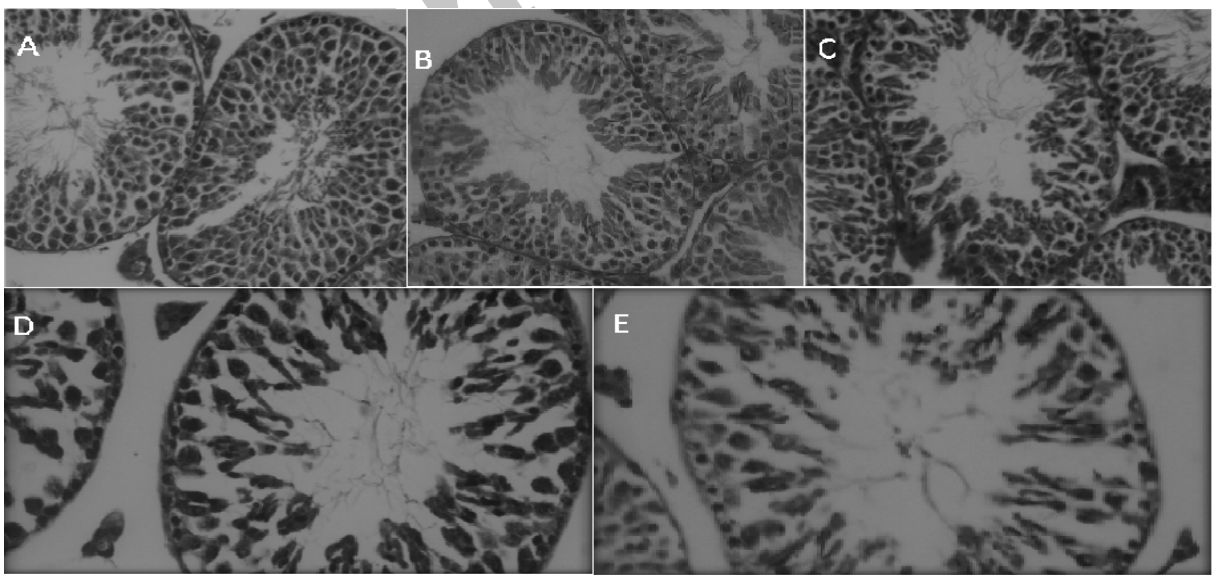
Archive of SID
www.SID.ir

گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین در شمارش سلول‌های اسپرمی از اپیدیدیم کاهش معنی‌دار در گروه سه و چهار تجربی نسبت به گروه کنترل دیده شد. فتومیکروگراف‌های A تا E بیانگر این موضوع است که در گروه‌های تجربی که عصاره دریافت کرده‌اند کاهش در تعداد سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوزوئید، اسپرماتوسیت اولیه و لایدیگ نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود، قطر لایه ژرمینال کم شده و فضاهای خالی بیشتری نسبت به گروه کنترل به چشم می‌خورد. این کاهش در گروه‌های مورد آزمایش ۳ و ٤ محسوس‌تر است (شکل شماره ۱). کاهش سلول‌ها در گروه‌های تجربی معنی‌دار است (جدول شماره ۲). شمارش اسپرم اپیدیدیمی با لام‌نئوبار نیز کاهش در گروه تجربی ۳ و ٤ نشان داد (جدول شماره ۳).

همچنین میزان هورمون FSH، LH و تستوسترون در گروه‌های تجربی کاهش یافته بود ولی این میزان در گروه‌های تجربی ۳ و ٤ نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت (جدول شماره ٤).

بحث

در این مطالعه عصاره‌ی هیدروالکلی دانه کرچک با غلظت‌های ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ٤۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر روند اسپرماتوژنز موش به وسیله محاسبه درصد ماده ژنتیکی اسپرم، زیستایی اسپرم‌ها و سنجش هورمونی و شمارش سلولی در بافت بیضه و شمارش اسپرم اپیدیدیم بررسی و معلوم شد که میزان آسیب رشته DNA (درصد ماده ژنتیکی اسپرم) در گروه‌های تجربی با دوز بالاتر بیشتر است. زیستایی اسپرم‌ها و میزان هورمون‌های جنسی و تعداد سلول‌های اسپرمی اپیدیدیم در گروه‌های تجربی دریافت‌کننده عصاره ۳ و ٤ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار نشان داد. مطالعات مشابه اثر عصاره دانه کرچک را به خاصیت لکتینی ریسین که در بخش سمی دانه وجود دارد نسبت می‌دهند، در واقع لکتین استخراج شده از دانه کرچک، ریسین نام گرفته است [۱۰ – ۸]. در مطالعه‌ای مکانیسم اثر ریسین بر سلول‌ها را فعالیت لیپولیتیک این ماده دانسته و عنوان شده است که ریسین فسفولیپیدهای غشای سلول را هیدرولیز می‌کند. سلول‌های سرتولی با توجه به حضور گلیکوکانجوگیت‌ها (Glycocojugates) هدف مناسبی برای ریسین هستند، مطالعات دیگر نیز این مسأله را تأیید کرده‌اند [۱۲، ۱۱].



شکل شماره ۱– فتومیکروگراف از بافت بیضه و لوله‌های سمی نیفر به ترتیب در گروه کنترل (A)، تجربی یک (B)، تجربی دو (C)، تجربی سه (D)، تجربی چهار (E) با ٤۰x

www.SID.ir

جدول شماره ۲- مقایسه تعداد سلول‌های رده اسپرمی و لایدیگ در گروه کنترل و گروه‌های تجربی نتایج به صورت Mean ± SD بیان شده است.

تعدادسلول‌ها / گروه‌ها	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتوسیت اولیه	تعداد اسپرماتید	تعداد اسپرم	تعداد لایدیگ
گروه کنترل	۱۱/۳۵ ± ۱/۲۸	۷/۶۱ ± ۱/۱٤	۱۰/۱۱ ± ۱/۳۲	۱۲/۹۲ ± ۱/۸۹	۰/۹۰ ± ۰/۲٤
غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	٦/٦۳ ± ۱/۰۸*	۳/۹۲ ± ۰/۹۵*	٤/۹۹ ± ۰/۸۰*	٦/٦۲ ± ۱/۲٦*	۰/٥٤ ± ۰/۲۰*
غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	٦/۲۲ ± ۰/٤٥*	۳/۹۰ ± ۰/٥۳*	٤/۷۳ ± ۰/۷۷*	٤/٤۸ ± ۰/٤۸*	۰/٤٤ ± ۰/۲۰*
غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	٥/٤۰ ± ۰/۸۲*	۳/٦۰ ± ۰/٦۲*	٤/٦۸ ± ۱/۱۳*	٤/۱۰ ± ۰/۹۱*	۰/٦۱ ± ۰/۱۳*
غلظت ٤٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم	٥/۰٦ ± ۰/۸٥*	۲/٤۸ ± ۰/٦٥*	۳/۳۱ ± ۰/۳۸*	۳/۰٥ ± ۰/۷۳*	۰/۲۹ ± ۰/٥۰*

علامت * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ بین گروه‌های تجربی و گروه کنترل می‌باشد.

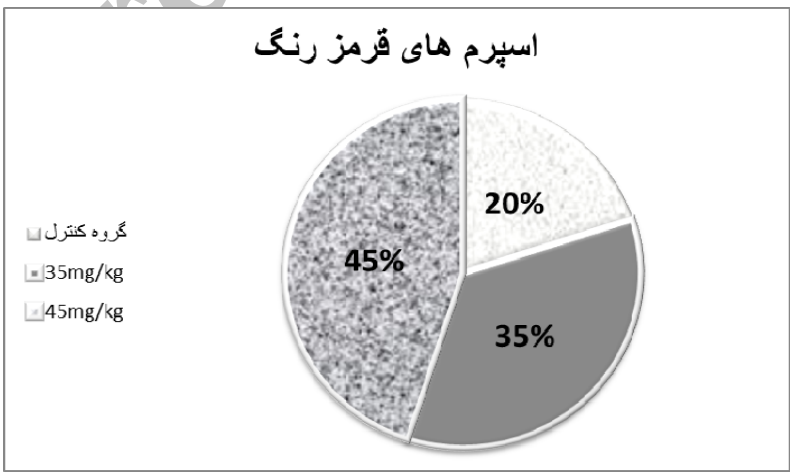
جدول شماره ۳- میانگین شمارش اسپرمی با لام نئوبار

گروه‌ها	میانگین شمارش اسپرمی با لام نئوبار
گروه کنترل	۲۳٥۰۰۰۰
غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۲۰۰۰۰۰
غلظت ٤٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۸٥۰۰۰۰

جدول شماره ٤- مقایسه میزان هورمون‌های جنسی در گروه کنترل و گروه‌های تجربی نتایج به صورت Mean±SD بیان شده است

میزان هورمون‌ها / گروه‌ها	LH	FSH	تستوسترون
گروه کنترل	۰/۳۰ ± ۰/۲۷	۲/۰۸ ± ۰/۳۰	۰/۷٦ ± ۰/۷۰
غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۰/۲۱ ± ۰/۱٥	۱/۷۲ ± ۰/٥۷	۰/٦٥ ± ۰/۲٤
غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۰/۱۹ ± ۰/۱۰	۱/٥۲ ± ۰/۳٤	۰/٥۱ ± ۰/۳٦
غلظت ۳۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۰/٤ ± ۰/۰۲*	۱/۲٥ ± ۰/۱۰*	۰/۳۳ ± ۰/۱۹*
غلظت ٤٥ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۰/۳ ± ۰/۰۱*	۱/۱۹ ± ۰/۰٥*	۰/۲۸ ± ۰/۱۲*

علامت * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p <۰/۰۵ بین گروه‌های تجربی و گروه کنترل می‌باشد.



نمودار شماره ۱- درصد دناتوره شدن DNA در گروه‌های تجربی ۳ و ٤ در مقایسه با گروه کنترل این تفاوت‌ها افزایش معنی‌داری در سطح p<۰/۰۵ دارند.

www.SID.ir

اندازه بیضه به شدت با تعداد سلول‌های سر تولی و تولید اسپرم مرتبط است، این سلول‌ها دارای آنزیم آروماتاز هستند. این آنزیم می‌تواند آندروژن را به استروژن‌ها تبدیل کند که در امر اسپرماتوژنز ضروری است. مطالعات نشان داده که مهارکننده آنزیم آروماتاز می‌تواند باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها و کاهش تحرک آنها شود [۱۳]. مهار اسپرماتوژنز از طریق برداشتن هیپوفیز باعث کاهش محسوس در وزن بیضه‌ها می‌شود. همچنین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز یکی دیگر از شاخص‌های تعیین‌کننده اندازه بیضه‌ها است [۱۵ – ۱٤]. در این مطالعه نیز این کاهش در بیضه راست نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود. ضخامت لایه ژرمینال در لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های تجربی دو، سه و چهار (غلظت‌های ٤٥، ۳۵، ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از وزن بدن) کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت. اثر مستقیم بر اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز، احتمالاً باعث کاهش تعداد سلول‌های دودمانی سازنده اسپرم می‌شود و غلظت بالای عصاره، بیشترین کاهش تعداد سلول‌ها را القاء می‌کند. مطالعات نشان داده است که دژنره شدن اپیتلیوم ژرمینال حیوانات تیمار شده با داروهای گیاهی می‌تواند به‌دلیل تغییرات در عمل استروئیدوژنز آنها باشد [۱٦].

کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اسپرم، اسپرماتوگنی، اسپرماتید و اسپرماتوسیت اولیه و لایدیگ نسبت به گروه کنترل دیده شد. کاهش اسپرماتوگونی‌ها مانع از تقسیمات میتوزی می‌شود. از این رو تعداد اسپرماتوسیت‌ها نیز کم شده است، همچنین کاهش سلول‌های اسپرماتوسیت با کاهش سلول‌های اسپرماتید و اسپرم همراه بود.

بر اساس پژوهش‌های انجام شده روند پیچیده اسپرماتوژنز و گذر از سلول‌های ژرمینال تا رسیدن به مرحله بلوغ سلول‌های جنسی در گروی مصون ماندن از ضایعات پاتولوژیک و سمیت سلولی (Cytotoxicity) است که این پدیده را مورد تهدید قرار می‌دهد [۱۷].

به نظر می‌رسد علت کاهش‌ها در پژوهش حاضر نیز ترکیبات و موادی است که در دانه گیاه کرچک وجود دارد. ریسین ماده سمی موجود در دانه کرچک نوعی پروتئین سمی به نام توکساآلبومین (Toxalbu min) است که از سموم پروتوپلاسمی می‌باشد. ماده سمی دیگر در دانه ریسینین نام دارد. این دو ماده در زمان عصاره‌گیری به عصاره نیز منتقل می‌شوند و جزء فیتوتوکسین‌ها طبقه‌بندی شده‌اند. مکانیسم اثر این دو ترکیب جلوگیری از ساخت پروتین‌های مورد نیاز در سلول به وسیله غیرفعال کردن ریبوزوم‌ها و اختلال در متابولیسم سلول و در نتیجه مرگ سلول است.

به طور معمول اتصال غشای پلاسمایی سلول‌های سرتولی و سلول‌های رده اسپرمی باعث بلوغ اسپرم می‌شوند. اختلال در سلول‌های سرتولی باعث انتشار سلول‌های نابالغ در مقاطع بافتی بیضه می‌شود. این امکان هم وجود دارد که استفاده از عصاره کرچک در عملکرد سلول‌های سرتولی اختلال ایجاد کند و یا اثر مستقیم بر روی سلول‌های لایدیگ داشته باشد، در نتیجه باعث از هم گسیختگی سلول‌های زایای اولیه و کاهش در تعداد سلول‌های رده اسپرمی شود [۱۸]. احتمالاً عصاره دریافتی با غشای آکروزوم سلول‌های اسپرمی واکنش داده و باعث آگلوتیناسیون اسپرم‌ها شده است در مطالعات دیگری نیز به این مورد اشاره شده است [۲۱ – ۱۹].

احتمال دیگر برای بروز این اثرات وجود، اسید ریسینولئیک است. روغن دانه کرچک به طور عمده از گلیسیریدهای اسید ریسینولئیک تشکیل شده که با خوردن روغن کرچک پس از هیدرولیز توسط لیپازهای روده کوچک، این اسید آزاد می‌شود [۲۲]. شاید نتایج مشاهده شده در این تحقیق را تا حدی بتوان به اسید ریسینولئیک آزاد منسوب کرد که باعث اسپرم‌کشی می‌شود و احتمالاً این اثر در بیضه و اپیدیدیم از طریق ممانعت از اعمال استروئیدوژنزاست. در مطالعه‌ای که با استفاده از شبیه‌سازی کامپیوتری انجام گرفته مکانیسم اتصال اسید ریسینولئیک به آکروزین انسانی بررسی و نشان داده شده است که اسید ریسینولئیک یک مهارکننده آکروزین انسانی و در نتیجه دارای اثر اسپرم‌کشی بوده و به عنوان پیشگیری از بارداری در جنس نر می‌توان از آن استفاده کرد [۲۳]. هورمون‌های استروئیدی محلول در چربی هستند. کاهش وزن بیضه و اپیدیدیم معمولاً با کاهش سطح سرمی هورمون تستوسترون همراه بوده است [۲٤]. نتیجه پژوهش حاضر اختلاف معنی‌داری در سطح تست‌های هورمونی در

Archive of SID
www.SID.ir

گروه‌های تجربی ۳ و ٤ نسبت به گروه کنترل نشان داد، که مشابه با پژوهش‌های دیگر می‌باشد که کاهش سطح تستوسترون سرم به علت جلوگیری از ترشح پروتئین متصل شونده به آندروژن را نشان داده‌اند [۷، ٦].

پژوهش‌های مختلف نشان داده که ریسین به عنوان یک لیپاز توانایی هیدرولیز فسفولیپیدها را که اجزای اصلی غشای سلول است را دارد [۲۵].

معلوم شده است ریسین که ماده سمی این گیاه است اگر به صورت خوراکی مصرف شود سمیت آن کمتر است در صورتی که تزریق یا استنشاق آن سمیت بیشتری دارد [۲٦]. در منابع دیگر نیز به این مسئله اشاره شده است [۱]. از طرف دیگر ریسین ماده‌ای محلول در آب است و در روغن کرچک دیده نمی‌شود. به نظر می‌رسد به همین دلیل در تجربه‌ای که با استفاده از روغن کرچک صورت گرفته است، تغییری در اسپرماتوژنز مشاهده نشده است [۲۷]. اما مطالعه حاضر با نتایج ناد (Nath) و همکارانش در سال ۲۰۱۳ که اثر مستقیم عصاره کرچک را بر اسپرم انسان بررسی کرده‌اند، همخوانی دارد [۲۱].

آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش سلول‌های اسپرماتوژنیک نشانه‌های مورفولوژیک اختلال در اسپرماتوژنز هستند [۲۸]. بنابراین با توجه به کاهش قطر لایه ژرمینال و کاهش سلول‌های رده اسپرمی این عصاره بر فرایند اسپرماتوژنز تأثیر داشته است و باعث اختلال در آن شده است.

نتیجه‌گیری

عصاره هیدروالکلی گیاه کرچک باعث کاهش در تعداد سلول‌های رده اسپرمی، کاهش سطح هورمون‌های جنسی، کاهش زیستایی اسپرم‌ها و آسیب به DNA ی اسپرم به طور وابسته به دوز می‌شود. به طوری که در بالاترین دوز در این مطالعه بیشترین آسیب به DNA دیده شد. بنابراین این گیاه در اسپرماتوژنز اختلال ایجاد می‌کند. اما اینکه آیا از این گیاه می‌توان در جهت تکوین و ساخت دارویی به عنوان پیشگیری‌کننده از بارداری در جنس نر استفاده کرد، نیازمند تحقیقات جامع و کامل در این زمینه از جنبه فارماکولوژی و سم‌شناسی است.

منابع

1. Zargari A. Pharmaceutical plants. Volume 4.Tehran University press. 1998, pp: 353 - 61.

2. Emami A, Shams Ardekani M and Nekoui Naini N. Traitement des maladies par les plants.1.Tehran: Chogan in collaboration perfection way. 2008, p: 239.

3. Sandhyakumary K, Bobby R G and Indira M. Antifertility effects of *Ricinus communis* (Linn) on rats. *Phytother. Res*. 2003 May; 17 (5): 508 - 11.

4. Isichei CO, Das SC, Okwuasaba F K, Uguru V E, Onoruvwe O, Olayinka A O and et al. Preliminary clinical investigation of the contraceptive efficacy and chemical pathological effects of RICOM-1013-J of *Ricinus communis* var minor on women volunteers. *Phytother. Res.* 2000 Feb; 14 (1): 40 - 2.

5. Okwuasaba F K, Osunkwoa U A, Ekwenchib M M, Ekpenyongb K I, Onwukemec K E, Olayinkad A O and and et al. Anticonceptive and estrogenic effects of a seed extract of *Ricinus communis* var minor. *Journal of Ethnopharmacol*. 1991; 34: 141 - 5.

6. Jasim M A and Al-Tahan F J. Study of the effect of decorticated and defatted Castor Seeds (*Ricinus communis* Linn) on Testosterone level and testicular architecture of male mice. *J. Tikrit University of Agricultural Sci*. 2012; 12 (2): 176 - 80.

7. Raji Y and KoladeOloyo A. Effect of methanol extract of *Ricinus communis* seed on reproduction of male rats. *Asian Journal of Androl*. 2006; 8: 115 – 21.

8. Al-Tahan F J and Al-Shaha O. M S. A Primary

Archive of SID
www.SID.ir

Study on Castor Beans Cultivated in Iraq and it's Content of the Toxic Substance Ricin. The Proceeding of the 2nd Technical Education Conference, Baghdad, Iraq. 1990, pp: 227 - 40.

9. Gruenwald J, Brendler T and Jaenicke C. PDR for herbal medicines. Medical Economics Company, Inc. 2000, p. 159.

10. Lombard M E, Helmy and Pieroni G. Lipolytic activity of ricin from *Ricinus sanguineus* and *Ricinus communis* on neutral lipids, *Biochem. J*. 2001; 358: 773 – 81.

11. Arenas M I, Madrid J F, Bethencourt FR, Fraile B and Paniagua R. Lectin histochemistry of the human testis. *J. Histochem.* 1998, 21: 332 - 42.

12. Gheri G, Sgambati E, Thyrion G D, Vichi D and Orlandini G E. The oligosaccharidic content of the glycoconjugates of the prepubertal descended and undescended testis: lectin histochemical study. *Ital. J. Anat. Embryol*. 2004; 109 (2): 69 - 84.

13. Ganay WF. Medical physiology twentieth edition. mc.Graw-Hill companies. 2001, p: 412.

14. Berndtson WE, Igboeli G and Parker WG .The numbers of sertoli cell in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of sperm autogenesis. *Biol. Reprod*. 1987; 37: 60 – 7.

15. Slegtenhorst-Eegdeman K E, De Rooi J DG, Verhoef-post M, Van de kant H J, Bakker CE, Oostra B.A and et al. Macroorchidism in FMRI Knochout mice is caused by increased sertoli cell proliferaction during testicular development. *Endocinol*. 1998; 139: 159 - 62.

16. Mazaro R, Di Stasi L C, Vieira Filho S A and Grava Kempinas W. Decrease in sperm number after treatment of rats with *Ausroplenckiapopulnea*. *Contraception* 2000; 62: 45 - 50.

17. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS and Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility an overview of the literature. *Reprod. Biomed. Online* 2004; 8 (6): 616 - 27.

18. Ekwere O E, McNeil RT and Okwuasaba F K. The effect o f *Ricinus Communis*-lnn (RICOM 1013-J) on semen parameters: A COMPARATIVE STUDY. *JPCS*. 2011; 1: 7 - 11.

19. Nath S, Choudhury M D, Roychoudhury S, Talukdar A D and Misro M M. Inhibition of Sperm Motility by *Ricinus communis* L. extract: A STEP Towards Male Contraception. In proceding of: 12th International congress of Ethnopharmacology 2012.

20. Nithya RS, Anuja MM, Rajamanickam C and Indira M. Rat sperm immobilisation effects of a protein from *Ricinus communis* (Linn.): an in vitro comparative study with nonoxynol-9.Andrologia. 2012 Dec; 44 (6): 381 - 7.

21. Nath S, Choudhury MD, Roychoudhury S, Talukdar AD and Misro MM. Male contraceptive efficacy of *Ricinus communis* L. extract. *J. Ethnopharmacol.* 2013 Aug 26; 149 (1): 328 – 34.

22. Final report on the safety assessment of *Ricinus Communis* (Castor) Seed Oil, Hydrogenated Castor Oil, Glyceryl Ricinoleate, Glyceryl Ricinoleate SE, Ricinoleic Acid,- Potassium Ricinoleate, Sodium Ricinoleate, Zinc Ricinoleate, Cetyl Ricinoleate, Ethyl Ricinoleate, Glycol Ricinoleate, Isopropyl Ricinoleate, Methyl Ricinoleate, and Octyldodecyl Ricinoleate. *Int. J. Toxicol*. 2007; 26 Suppl 3: 31 - 77.

23. Nath S, Das B, Chetia P, Saiki R, DuttaChoudhury M and Sharma G.D. Ricinoleic acid as male contraceptive: An *in silico* study. In Conference abstracts of the "International Conference on Recent Advances in Bioinformatics" held at KIIT University, Bhubaneswar, Orissa, India on September 3-5, 2010, P53, pp: 74 - 5.

24. Setty BS, Riar SS and Kar AB. Androgenic control of epididymal function in rhesus monkey and rabbit. *FertSteril*. 1977; 22: 674 – 81.

25. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh

Archive of SID
www.SID.ir

J. Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA*. 2005; 294 (18): 2342 – 51.

26. Saeidnia S and Abdollahi M. How Dangerous Could be the Receiving of a Ricin-Contaminated Letter? *Iranian Journal of Biotechnol*. 2013 August; 11 (3): 141 - 3.

27. Cleida A O, Kay C, Luiz R F and Hess R A. Infertility and Testicular Atrophy in the Antiestrogen-Treated Adult Male Rat. *Bio. Repro*. 2001 Sep.; 65 (3): 913 – 20.

28. Cameron DF, Murray F.T and Drylie D. D. Imterstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent men. *Anat. Rec*. 1985; 213: 53 - 62.

Archive of SID

www.SID.ir