تأثیر عصاره گیاه بومادران *Achillea millefolium L.* بر روند اسپرماتوژنز ومحور هورمونی هیپوفیز گوناد درموشهای بالغ *Balb/C*

پریسا کریشچی[۱]، کاظم پریور[۲]، سید علی حائری روحانی[۲]، عبدالحسین روستائیان[۲]

یافته / سال ششم / شماره ۲۲

چکیده

مقدمه: با توجه به مشکلات بی شمار ناشی از روند افزایش جمعیت، مطالعه روشهایی که بتواندبا پایین آوردن نرخ رشد جمعیت این روند را دچار وقفه سازد، حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق بررسی اثرعصاره گیاه بومادران بر روی باروری موشهای بالغ نر نژاد Balb / C بود.

مواد و روشها: دراین مطالعه که از نوع بنیادی –عملی است، عصاره به صورت الکلی (اتانولی) از گلهای گیاه تهیه گردید وپس از تعیین دوز کشنده (LD50) به میزان g/kg/bw ۱/۷، مقدار تزریق g/kg/bw ۱/۲ تعیین شد. تزریقات به روش درون صفاقی به مدت ۵ روز متوالی بر روی ۲۰ موش بالغ نر نژاد Balb / C با وزنی معادل ۳۲g-۲۸ انجام گرفت. در این تجربیات علاوه بر گروه تجربی از دو گروه کنترل و Sham(تزریق حلال) نیز استفاده گردید. دو هفته پس از آخرین تزریق، موشها بوسیله اتر بیهوش و سپس تشریح شدند. ابتدا خونگیری انجام گرفت و سپس بیضه و اپیدیدیم حیوانات جداسازی شده و پس از اندازه گیری قطر و وزن بیضه ها نمونه ها درمحلول بوئن تثبیت و برای مطالعات بافت شناسی آماده شدند.

یافته ها: نتایج بدست آمده از این تحقیق هیچگونه تغییر معنی داری در وزن حیوانات، وزن، حجم و قطر بیضه ها بین گروههای مختلف نشان نداد. مطالعه ساختار بافتی لوله های اسپرم ساز نشانگر از بین رفتن نظم سلولی، کاهش تعدادسلولهای زاینده و مرگ سلولی بود. مطالعه اپیدیدیم حیوانات مورد آزمون نشانگر وجود اسپرماتیدهای نابالغ در این ناحیه بود. مطالعات سنجش هورمونی نشانگر کاهش میزان LH وتستوسترون می باشد؛ اما تغییری در میزان FSH مشاهده شد.

نتیجه گیری: نتایج این کار تحقیقاتی نشان می دهد که عصاره گیاه بومادران را می توان بعنوان یک ترکیب ضد باروری در جنس نر مطرح کرد که اثرات آن برگشت پذیر است.

واژه های کلیدی: گیاه بومادران، اسپرماتوژنز، ناباروری، موشهای نژاد Balb/ C

۱- مربی ـ عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

۲- استاد ـ عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

www.SID.ir

مقدمه

بومادران گیاهی است متعلق به تیره کاسنی که از زمانهای بسیار قدیم برای درمان بیماریهای مختلف از آن استفاده می شده است. بررسی های علمی جدید، ضمن تأیید برخی از اثرات درمانی بومادران، جای آن را در ردیف گیاهان دارویی مفید محفوظ نگاه داشته است.

در سال ۱۹۹۴ مطالعاتی توسط توزیو[1] و همکارانش در رابطه با تأثیر عصاره گلهای بومادران بر روی سلولهای لوکمیا P–388 موشها صورت گرفت. نتایج حاصله نشانگر تأثیر مثبت آن بر روی سلولهای سرطانی ذکر شده بود که تیم تحقیقاتی مذکور این اثر را به سزکوئی ترپن های موجود در گیاه نسبت دادند (۱). مطالعات انجام گرفته توسط پتلوسکی[2] و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشانگر اثر ضد دیابتی این گیاه می باشد(۲).

مطالعات انجام گرفته توسط کاستنر[3] و همکارانش درسال ۱۹۹۳ نشان داده است که عصاره گیاه بومادران خاصیت ضد ادم و ضد التهابی دارد که این امر را به وجود سزکوئی ترپن لاکتون های موجود در گیاه نسبت داده اند (۳). در رابطه با تأثیر این گیاه بر روی سیستم تولید مثلی نتایج ضد و نقیضی در دسترس است. مطالعات انجام گرفته توسط دی لازلوو[4] همکارانش درسال ۱۹۵۴ نشانگر اثر مهاری عصاره این گیاه بر روی سیکل استروس می باشد (۴)؛ اما مطالعات انجام گرفته توسط بارنز[5] و همکارانش درسال ۱۹۷۵ نقض کننده آن می باشد (۷).

مونتاناری[6] و همکارانش در سال ۱۹۹۸ مطالعاتی بر روی اسپرماتوژنز موشها انجام دادند که نتایج حاصله نشانگر این است که بکارگیری عصاره اتانولی یا هیدروالکلی سرشاخه گلدار بومادران بازدارنده اسپرماتوژنز است (۶). با توجه به اثرات ضدباروری این گیاه در این پروژه اثرات عصاره الکلی گلهای بومادران بر روی فرآیند اسپرماتوژنز و باروری موشهای نژادBalb / C مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روشها

این مطالعه از نوع بنیادی ـ عملی بود که انجام آن شامل مراحل زیر بود:

۱- روش تهیه عصاره الکلی

پس از جمع آوری گلهای گیاه بومادران و خشک نمودن نمونه ها، برای تهیه عصاره الکلی،۵۰ گرم از گلهای خشک شده به وسیله آسیاب برقی نیم کوب گردیدو به آن ۵۰۰cc اتانول ۹۶٪ افزوده شد.

بعد ازسه روز سوسپانسیون حاصله با استفاده از قیف بوخنر صاف گردید و محلول زیر صافی در دستگاه روتاری (تحت شرایط خلاء) در دمای ۴۰°c تغلیظ شد. ماده حاصله که به صورت شیره سبز رنگی بود، با استفاده از گاز ازت کاملا خشک شد. به این ماده۴۳ قطره Tween- 40 افزوده شد و با استفاده از سرم فیزیولوژیکی به میزان ۱۰ : ۱ رقیق شد.

۲- روش تعیین مقدار LD50

به منظور بررسی آثار بیولوژیک عصاره الکلی گیاه وتزریق آن به حیوانات ابتدا LD50 تعیین گردید و با کاهش آن مقدار دوز آستانه ای مشخص شد.

به منظور محاسبه دوزی ازعصاره که در ۵۰ درصد حیوانات مورد مطالعه اثر کشندگی داشته باشد (LD50) از برنامه کامپیوتری PCS و بر اساس روش ویلکوسن – لیچفیلد[7] استفاده شد.

۳- حیوانات مورد آزمون

حیوانات مورد آزمایش ۲۰ موش نر نژاد Balb /Cدر محدوده وزنی ۳۲-۲۸ گرم بوده که پس از خریداری از انستیتو پاستور برای چندین نسل بصورت درون نژادی (Inbred) تکثیر شدند و سپس مورد آزمون قرار گرفتند. حیوانات از نظر روشنایی، درجه حرارت، آب و غذا درشرایط استاندارد نگهداری شده و سپس به شرح زیرمورد آزمون قرار گرفتند.

گروه اول: موشهای نر بالغ که در سن ۲ ماهگی جداسازی شدند و به مدت ۵ روز متوالی g/kg/bw ۱/۲ از عصاره تام را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند (n =۵).

1. Tozyo
2. Petlevski
3. Kastner
4. De Laszlo
5. B arnes
6. Montanari
7. Wilcoxon- Litchfield

Archive of SID
www.SID.ir

گروه دوم: حیوانات شم که به مدت ۵ روز متوالی ۱/۲ g/kg/bw از حلال مورد نظر را به صورت درون صفاقی دریافت نمودند (n =۵).

گروه سوم: حیوانات کنترل که هیچگونه تزریقی بر روی آنها صورت نگرفت (n =۵). لازم به ذکر است که کلیه تجربیات با سه تکرار انجام پذیرفتند.

۴- روش تهیه سرم خون

دو هفته پس از آخرین تزریق حیوانات بوسیله اتر بیهوش شدند و پس از تشریح خونگیری از سیاهرگ باب کبدی آنها صورت گرفت. خون حیوانات در لوله های آزمایش بطور آهسته ریخته شد و تا هنگام تشکیل لخته در دمای آزمایشگاه نگهداری شد.

به وسیله سواب لخته خون از جدار لوله آزمایش جدا گردید و به وسیله دستگاه سانتریفوژ با دور ۳۵۰۰ در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه سرم آنها جداسازی شد. سرم های خون به کمک سمپلر به لوله های اپندرف منتقل گردید و بصورت سر بسته در فریزر با برودت $-۲۰^{\circ}c$ نگهداری شد ودر زمان مناسب برای سنجش هورمونی به انستیتو غدد داخلی و متابولیسم منتقل شد.

۵- روش بررسی هیستولوژیکی

دو هفته پس از آخرین تزریق، حیوانات بوسیله اتر بیهوش شده، بیضه و اپیدیدیم آنها از بدن خارج گردیده و پس از مشاهدات ماکروسکپیک در فیکساتیو بوئن قرار داده شدند.

پس از تهیه بلوک های پارافینی و تهیه برشهای میکرونی، نمونه ها با هماتوکسیلین – ائوزین[1] رنگ آمیزی گردیدند و مطالعات بافت شناسی بر روی آنها صورت گرفت.

۶- روش مطالعه برگشت باروری

عده ای از موشها دو هفته و عده ای دیگر دو ماه پس از آخرین تزریق با موشهای ماده هم قفس شدند تا توانایی باروری موشهای نر مورد بررسی قرار گیرد.

۷- روشهای آماری

داده ها به صورت میانگین + خطای معیار برای هر گروه آزمایشی گزارش شد. سپس به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروهها از آزمون آنالیز واریانس یک عاملی (ANOVA)و به دنبال آن، آزمون توکی -کرامر[2] استفاده شد و حد خطای $P< ۰/۰۵$ به لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

۱- تغییرات مورفولوژیکی

نتایج بدست آمده از بررسی وزن حیوان، وزن بیضه، قطر کوچک و بزرگ بیضه اختلاف معنی داری بین گروههای مورد آزمون نشان نداد (جدول ۱).

جدول شماره ۱ـ تأثیر تزریق درون صفاقی عصاره گیاه بومادران به مدت ۵ روز بر روی وزن بدن، وزن، حجم و قطر بیضه موشها

گروهها	وزن اولیه حیوان (g)	وزن نهایی حیوان (g)	وزن بیضه (g)	حجم بیضه (ml)	قطر کوچک بیضه (mm)	قطر بزگ بیضه (mm)
کنترل	۲۹/۷۳ ± ۰/۵۲	۳۳/۷۲ ± ۰/۵	۰/۰۹۴ ± ۰/۰۰۹	۰/۱۰۳ ± ۰/۰۲	۰/۴۷۸ ± ۰/۰۴	۰/۶۳۴ ± ۰/۰۵
شم	۲۹/۷۷ ± ۰/۳۹	۳۴/۴۳ ± ۰/۶۳	۰/۰۹۶ ± ۰/۰۱۱	۰/۱۱۸ ± ۰/۰۴	۰/۴۹۸ ± ۰/۰۵	۰/۶۶۲ ± ۰/۰۶
تجربی	۳۰/۲۳ ± ۰/۴۳	۳۳/۳ ± ۰/۹۶	۰/۰۹ ± ۰/۰۱	۰/۱۰۶ ± ۰/۰۱۶	۰/۴۸۴ ± ۰/۰۳	۰/۶۴۲ ± ۰/۰۵

۲- تغییرات هیستولوژیکی

بررسی برشهای بافتی لوله های اسپرم ساز نشانگر بی نظمی درآرایش سلولهای اسپرماتوژنیک بود. مرگ سلولی بصورت هسته های پیکنوتیک در داخل لوله ها مشاهده گردید (تصویر ۲) (تصویر ۱ مربوط به گروه کنترل است).

کاهش تعدادسلولهای زاینده، حفره دار شدن لوله ها و حضور بقایای سیتوپلاسمی در گروههای تجربی از دیگر تغییرات مشاهده شده می باشد (تصویر ۴، ۳).

1. Hematoxylin- Eosin
2.Tukey - Kramer

Archive of SID

www.SID.ir

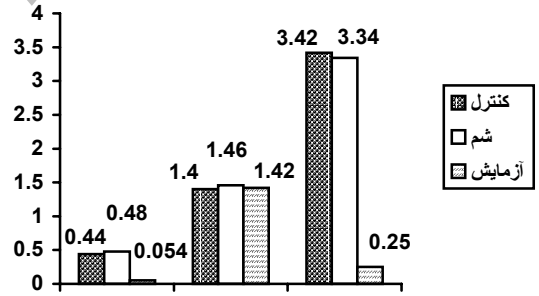
در بررسی برش های بافتی اپیدیدیم تغییری در تعداد اسپرماتوزوئیدهای موجود در لومن مشاهده نگردید؛ اما تعداد فراوانی اسپرماتیدهای نابالغ مشاهده شد (تصویر ۵).

۳- تغییرات هورمونهای جنسی

اندازه گیری میزان FSH[1] و LH[2] به روش IRMA[3] وتستوسترون به روشRIA[4] نشانگر کاهش معنی داری در میزان LH و تستوسترون می باشد اما تغییر معنی داری در میزان FSH نسبت به گروههای کنترل و شم مشاهده نشد (نمودار ۱).

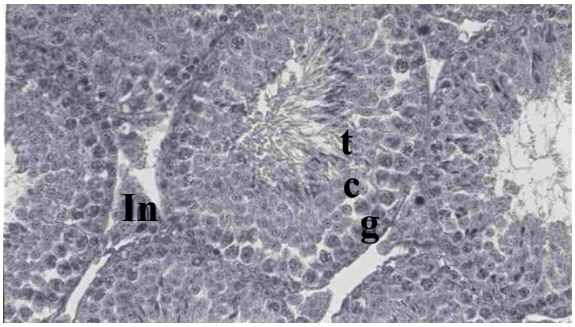
۴- میزان برگشت باروری

نتایج نشان داد که عصاره الکلی بومادران به میزان ۱/۲g/kg/ bw (بمدت ۵ روز متوالی) میزان باروری را دو هفته پس از تزریق به صفر می رساند؛ اما اثر آن برگشت پذیر است به طوریکه دو ماه پس ازتزریق ۵۳ درصد حیوانات توانایی باروری خود را بدست آوردند.



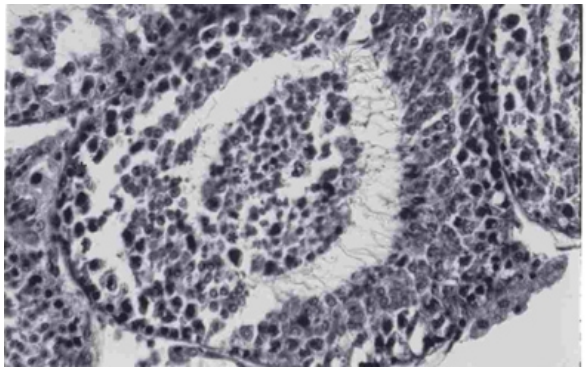
نمودار شماره ۱ـ تأثیر تزریق درون صفاقی عصاره بومادران به مدت ۵ روز متوالی برروی هورمونهای محور هیپوفیز گوناد

از نظر آماری در ۰/۰۰۱ >Pمعنی دار است



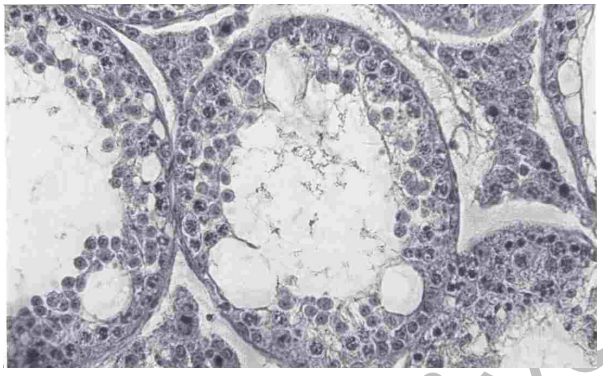
تصویر شماره ۱ـ فتومیکروگراف ازمقطع عرضی لوله های اسپرم ساز و بافت بینابینی در گروه کنترل (بزرگنمایی ۴۰۰ ×)

g: اسپر ماتوگونی، C : اسپرماتوسیت اولیه، t : اسپرماتید، In: بافت بینا بینی

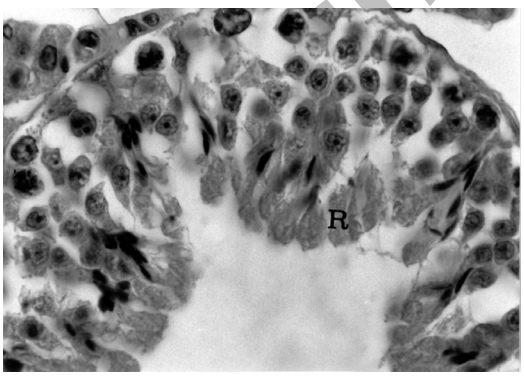


تصویر شماره ۲ـ فتو میکروگراف از مقطع عرضی لوله های اسپرم ساز درگروه تجربی (بزرگنمایی ۴۰۰ ×)

سلولهای زاینده بدون نظم سلولی درداخل لوله قرار گرفته اند و هسته های پیکنوز (پیکان) نمایان می باشند.



تصویر شماره ۳ـ فتو میکروگراف ازمقطع عرضی لوله های اسپرم ساز در گروه تجربی که حفره دار شدن بافت و کاهش تعداد سلولهای اسپرماتوژنیک قابل مشاهده می باشد (بزرگنمایی ۴۰۰ ×)

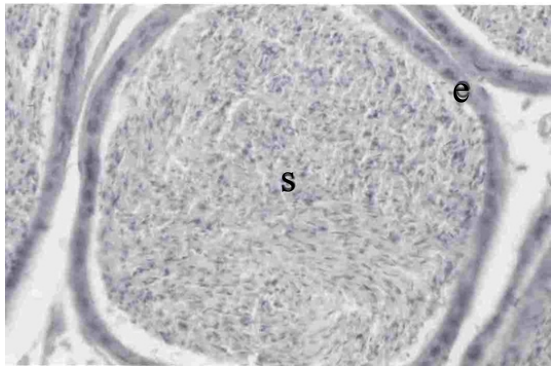


تصویر شماره ۴ـ فتو میکروگراف از مقطع عرضی لوله های اسپرم ساز در گروه تجربی (بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×)

R : بقایای سیتو پلاسمی

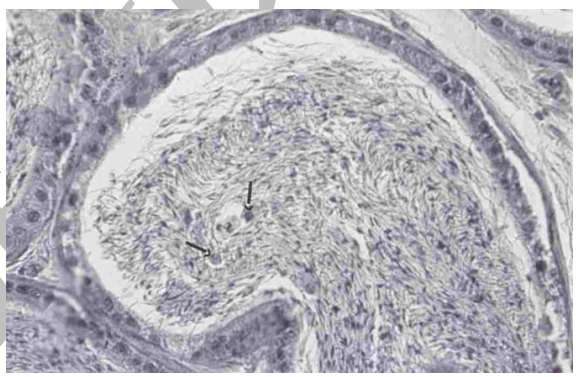
1. Follicles – Stimulating Hormone
2. Leuteinizing Hormone
3. Immunoradiometric assay
4. Radioimmunoassay

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر شماره ۵ـ فتو میکروگراف از مقطع عرضی اپیدیدیم در گروه کنترل (بزرگنمایی ۴۰۰ ×)

e: اپی تلیوم s: اسپرماتوزوئید



تصویر شماره ۶ـ فتو میکروگراف از مقطع عرضی اپیدیدیم در گروه تجربی (بزرگنمایی ۴۰۰ ×). اسپرماتیدهای نابالغ (پیکان) در داخل لومن پراکنده اند.

بحث

نتایج حاصل از این پروژه تحقیقاتی نشانگر تأثیر عصاره الکلی گلهای بومادران بر روند اسپرماتوژنز و محور هورمونی هیپوفیز گوناد است. بررسی هورمونهای سرم خون نشانگر کاهش مقدار LH و تستوسترون درگروههای تجربی است؛ اما تغییری در میزان FSHمشاهده نگردید. نتایج حاصل از تحقیقات انجام گرفته برروی عصاره گیاهان مارتینیا آنوا[1] (۷) و آزادیراکتا ایندیکا[2] (۸)که به عنوان ماده ای موثر در جلوگیری از باروری در جنس نر مطرح شدند، مطابق با نتایج مطالعه حاضر است. دیم و راج[3] در سال ۱۹۷۷ گزارش داده اندکه تزریق آنتی سرم LH باعث کاهش LH ومتعاقب آن کاهش استروئیدوژنز سلولهای لیدیگ و ترشح تستوسترون توسط این سلولها می گردد (۹). آغاز و حفظ اسپرماتوژنز نیاز به مقدار نرمال FSHو LH در زمان قبل و پس از بلوغ جنسی دارد (۱۰) به طوریکه تمایز اسپرماتوسیت های مرحله پاکیتن میانی و اسپرماتیدهای مرحله ۷ تحت تاثیر مستقیم تستوسترون قرار دارند (۱۱) و یا اینکه فقدان FSH و LH می تواند بطور غیر مستقیم بر روی آنها تأثیر گذارد (۱۰).

فازئولینون[4] که بعنوان یک ترکیب ضدباروری معرفی شده است از طریق مهار آنزیم RNAپلیمراز و تولید پروتئینها باعث کاهش میزان هورمونهای سرم خون گشته و در امر اسپرماتوژنز اختلال ایجاد می نماید (۱۲). عصاره بومادران نیز احتمالا از طریق مهار سنتز پروتئینها باعث کاهش ترشح LH گردیده که این امر باعث عملکرد غیر نرمال سلولهای لیدیگ و کاهش ترشح تستوسترون توسط این سلولها شده و نهایتا منجر به ایجاد اختلالاتی در روند اسپرماتوژنز گشته است.

مطالعات میکروسکوپی نشانگر بی نظمی وبهم ریختگی در آرایش سلولهای اسپرماتوژنیک می باشدکه این اختلالات در تیمار با عصاره کاریکا پاپایا[5] (۶) نیز مشاهده شده است. از دیگر تغییرات حاصله مشاهده فضاهای خالی بین سلولهای اسپرماتوژنیک و مشاهده هسته های پیکنوز در داخل لوله های اسپرم ساز بود که مطالعات انجام گرفته بر روی گل ختمی که دارای اثر مهاری بر روی روند اسپرماتوژنز می باشد نیز نشانگر این تغییرات است (۱۳). وجود بی نظمی در بافت بیضه احتمالا ناشی از تأثیر عصاره بر روی اتصالات سلولی می باشد؛ زیرا اتصالات شبه دسموزومی بین سلولهای سرتولی و زاینده، کنترل کننده جابجایی سلولهای زاینده از لایه بازال به لومن لوله های اسپرم ساز است. مطالعات انجام گرفته توسط مونتاناری[6] و همکارانش در سال ۱۹۹۸ نشان داده است که بکارگیری عصاره اتانولی و هیدرو الکلی گلهای بومادران باعث واکوئله شدن لوله های اسپرم ساز و نکروز شدن سلولهای زاینده می گردد (۱۴) که نتایج این پژوهش نیز تأیید کننده نظریات آنها است. این پژوهشگران تغییراتی دربافت اپیدیدیم

1. Martynia annua
2. Azadairachta indica
3. Dym &Raj
4. Phaseolinone
5. Carica papaya
6. Montanari

Archive of SID
www.SID.ir

مشاهده ننمودند که مغایر با نتایج به دست آمده از این پژوهش است؛ زیرا تعداد فراوانی اسپر ماتیدهای نابالغ در داخل اپیدیدیم حضور دارند که باعث تشکیل اسپرمهای غیر طبیعی می گردند.

یکی از مسائل جالب توجه این پروژه تحقیقاتی برگشت باروری در گروههای مورد آزمون بود. این مسئله، نشان می دهد با گذشت زمان اثرات عصاره از بین رفته وسلولهای آسیب دیده شروع به ترمیم شدن می نمایند. امید است با انجام تحقیقات بیشتر شاهد مصرف این گیاه بعنوان یک ترکیب پیشگیری از حاملگی باشیم.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران که در تامین بودجه این پژوهش همکاری نمده اند، تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Tozyo T, Yoshimura Y, Sakurai K, Uchida N, Takeda Y, Nakai H. Novel antitumor sesquiterpenoids in Achillea millefolium. Chem Pharm Bull 1994; 42: 1096-1100
2. Petlevski R, Hadzija M. Slijepcevic M. Effect of antidiabetis herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. J Ethnopharmacol 2001; 75: 181–184
3. Kastner U, Sosa S, Tubaro A, Breuer J, Rucker G, Loggia R. Anti- edematous activity of sesquiterpene lactone from different taxa of the Achillea millefolium group.Planta Med 1993; 59: 669-675
4. De Laszlo H, Henshaw P. Plant materials used by primitive people to effect fertility.Science 1954; 119: 626-628
5. Barnes C, Price J, Hughes R. An examination of some reputed antifertility plants. Lloydia, 1975; 38: 135- 140
6. Kusemiju O, Noronha C, Okanlawon A. The effect of crude extract of the bark of Carica papaya on the seminiferous tubules of male Sprague- Dawley rats. Niger Postgrade Med J 2002; 9: 205-209
7. Mali PC, Ansari AS, Chaturvedi M. Antifertility effect of chronically administered Martynia annua root extract on male rats. J Ethnopharmacol 2002; 82: 61-67
8. Raji Y. Udoh US, Mewoyeka OO.Onoye FC, Bolarinwa AF. Implication of reproductive endocrine malfunction in male antifertility efficacy of Azadirachta indica extract in rats. Afr J Med Sci 2003; 32: 159-165
9. Dym M, Raj M. Response of adult rat Sertoli cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. Biol Reprod 1977; 17: 626 – 696
10. Steinberger E. Hormonal regulation of spermatogenesis. Plenum Press. New York, 1975: 337-352
11. Chowdhury A. Dependence of testicular germ cells on hormones : a quantitative study in hypophysectomized testosterone treated rats. J Endocrinol1970; 82: 331- 340
12. Chakraborty S, Lala S. Assesment of the antifertility effect of phaseolinone. Contraception, 1998; 58: 183-191
13. Kholkute S. Effect of Hibiscus rosa sinesis on spermatogenesis and accessroy reproductive organs in rats.planta Med 1977; 31: 127 – 135
14. Montanari T, Carvaho J, Dolder H. Antispermatogenic effect of Achillea millefolium L: in mice. Contraception, 1998; 58: 309-313

Archive of SID

www.SID.ir