مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دهم، شماره یازدهم، بهمن ۹۵
صفحه ۲۵ الی ۳۳

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر عصاره هیدروالکلی گل بومادران بر لقاح داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنین‌ها در موش سفید کوچک آزمایشگاهی

ندا اصل‌ایرانیفام[1*]، شاپور حسن‌زاده[2]، غلامرضا نجفی[2]

چکیده

زمینه و هدف: گیاه بومادران یکی از قدیمی‌ترین و شناخته‌شده‌ترین گیاهان دارویی با خواص آنتی‌اکسیدانتی بالقوه است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات عصاره هیدروالکلی گل بومادران در سه دوز مختلف بر توان باروری آزمایشگاهی و روند رشد رویانی در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۲۴ موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر (نژاد NMRI)، به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: گروه اول سرم فیزیولوژی را با دوز ۰/۱میلی‌لیتر برکیلوگرم دریافت کردند، و به گروه دوم، سوم و چهارم عصاره بومادران به ترتیب با دوز ۷۵ ، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم داده شد. تیمار به مدت ۳۵ روز ادامه داشت. در پایان، موش‌ها از طریق جابه‌جایی مهره گردنی آسان‌کشی شدند، و از دُم اپیدیدیم برای جمع‌آوری اسپرم‌ها استفاده شد. میزان باروری داخل آزمایشگاهی و روند رشد جنینی در تمامی گروه‌ها بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در گروه‌های دریافت‌کننده دوز کم و متوسط عصاره بومادران، میزان لقاح و تعداد بلاستوسیست‌ها، افزایش و تعداد جنین‌های متوقف‌شده، کاهش نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، معنی‌دار نبود، اما در گروه دریافت‌کننده دوز زیاد عصاره، میزان لقاح و تعداد بلاستوسیست‌ها، کاهش ($p<0/05$) و تعداد جنین‌های متوقف‌شده، افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشت ($p<0/01$).

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این مطالعه، عصاره هیدروالکلی بومادران، رفتار وابسته به دوز داشت؛ به‌نحوی‌که در دوز کم و متوسط، تأثیر معنی‌داری نداشت، اما در دوز زیاد سبب کاهش توان باروری آزمایشگاهی و روند رشد جنینی گردید.

کلید واژه‌ها: بومادران؛ باروری آزمایشگاهی؛ موش.

[1]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

[2]گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
ندا اصل ایرانیفام، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
n.iranifam@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۰

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Asliranifam N, Hasanzadeh Sh, Najafi Gh. The effects of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* on *In Vitro* fertilization (IVF) and embryonic development process in mice. Qom Univ Med Sci J 2017;10(11):25-33. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

مقدمه

امروزه، مسائل مربوط به باروری و ناباروری ازجمله مسائل چالش‌برانگیز در علم پزشکی است. براساس مطالعات صورت‌گرفته، ۴۵-۲۵٪ مردان نابارور دارای سطوح بالایی از گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species, ROS) در نمونه‌های مایع منی خود بوده‌اند (۱). گونه‌های فعال اکسیژن، عوامل اکسیدکننده بسیار فعالی از گروه رادیکال‌های آزاد مانند یون هیدروکسیل، سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال پروکسیل و یون هیپوکلریت (۲) هستند. البته وجود مقادیر اندکی ROS برای اسپرم جهت لقاح، واکنش آکروزومی، تحرک و ظرفیت‌یابی ضروری است (۳). استرس اکسیداتیو، بیانگر نوعی عدم تعادل بین تولید ROS و مکانیسم‌های مهاری آن است (۴). اسپرم‌ها حساسیت ویژه‌ای نسبت به آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو دارند؛ چراکه غشای پلاسمایی آنها دارای مقادیر بالایی از اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (PUFAs) است (۵)، که ROS به این PUFAs حمله کرده و موجب شروع مجموعه‌ای از واکنش‌های شیمیایی تحت عنوان پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (۶). از طرفی، میزان آنزیم‌های مهاری موجود در سیتوپلاسم اسپرم‌ها، بسیار اندک است (۵)، و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت داخل سلولی نیز قادر به محافظت از غشای پلاسمایی احاطه‌کننده آکروزوم و دُم اسپرم نیستند (۷). میزان آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو به ماهیت و میزان ROS، مدت زمان قرارگرفتن در معرض ROS و فاکتورهای خارج سلولی مانند دما و اجزای محیط (یون‌ها، پروتئین‌ها و آنتی‌اکسیدانت‌ها) بستگی دارد (۸). درصورتی‌که میزان آسیب به DNA اسپرم ناچیز باشد، خود اسپرم و یا اووسیت قادر به ترمیم DNA آسیب‌دیده خواهند بود (۹)، اما درصورت گسترده بودن آسیب‌ها، آپوپتوز و قطعه‌قطعه‌شدن جنین، امری محتمل است (۱۰). همان‌طورکه پیشتر نیز گفته شد، به سبب کمبود آنزیم‌های سیتوپلاسمی، اسپرم‌ها قادر به ترمیم آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو نیستند. مطالعات نشان می‌دهد آنتی‌اکسیدانت‌ها دارای اثرات گسترده‌ای بوده و قادرند از اسپرم در برابر ناهنجاری‌های ناشی از ROS محافظت کنند. این ترکیبات همچنین موجب مهار ROS تولیدشده توسط لکوسیت‌ها و بهبود کیفیت مایع منی شده و از قطعه‌قطعه‌شدن DNA و بلوغ نابه‌هنگام اسپرم‌ها جلوگیری می‌کنند (۳). گیاه بومادران با نام علمی *Achilleamillefolium* متعلق به شاخه دانه‌دارها، رده دو لپه‌ای‌ها، راسته آستراسه (*Asteraces*) و تیره کاسنی می‌باشد و گیاهی است چندساله، خودرو، ریزوم‌دار با ساقه‌ای مستقیم تا ارتفاع یک‌متر و برگهای مستطیلی نیزه‌ای که به بخش‌های متعدد باریک تقسیم شده‌اند. دوره گلدهی بومادران اردیبهشت‌ماه است. بخش‌های مورد استفاده گیاه، سرشاخه‌های گلدار آن بوده که طعم تلخ و بوی قوی دارند (۱۱). در طب قدیم از این گیاه به‌عنوان داروی تب‌بر، ضدانگل، ضدهپاتیت، ضدسرطان، ضدالتهاب و ضدمالاریا استفاده می‌شد (۱۲). گیاه بومادران با داشتن ترکیبات مختلف دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدآپوپتوزی است (۱۳). در رابطه با تأثیر این گیاه بر روی سیستم تولیدمثلی، نتایج ضد و نقیضی دردسترس است. براساس مطالعه Shalizar Jalali و همکاران، عصاره آبی گیاه بومادران سبب بهبود نسبی اثرات نامطلوب داروی سیکلوفسفامید در دستگاه تولیدمثلی نر می‌شود (۱۴). Akbarizadeh و همکاران نیز گزارش کردند عصاره آبی گیاه بومادران به سبب دارابودن ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه، سبب افزایش کیفیت اسپرم در رت‌های تحت تیمار با داروی سیکلوسپورین می‌شود (۱۵)، اما محققان دیگر نشان داده‌اند عصاره گل بومادران دارای اثر آنتی‌اسپرماتوژنیک است (۱۶). با توجه به اینکه امروزه، برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده از گیاهان دارویی ازجمله بومادران در اکثر کشورها در حال افزایش است و این گیاهان دارویی علاوه بر اثرات مفید درمانی دارای یک‌سری عوارض جانبی نیز هستند و از آنجایی‌که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد اثر بومادران بر روی توان باروری آزمایشگاهی صورت نگرفته، در این تحقیق اثرات مفید و مضر عصاره هیدروالکلی گل بومادران در سه دوز مختلف بر روی توان باروری آزمایشگاهی و روند رشد رویانی بررسی گردید.

روش بررسی

سرشاخه‌های گلدار گیاه بومادران پس از شناسایی علمی توسط اساتید گیاه‌شناسی دانشکده علوم با هرباریوم نامبر ۷۵۱۹، از اطراف شهر ارومیه در خردادماه جمع‌آوری شد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

گلهای گیاه پس از جداسازی، در اتاق تاریک با دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد، خشک شده و به‌وسیله آسیاب برقی، خرد و به‌صورت پودر درآمدند، سپس پودر تهیه‌شده با اتانول ۷۰٪، مخلوط شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. در ادامه، سوسپانسیون حاصله با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و محلول زیر صافی در دستگاه تقطیر خلأ (Rotatory Evaporator) با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به میزان ۱/۱۲ حجم اولیه تغلیظ شد، پس از خشک‌شدن کامل و توزین عصاره‌ها، درصد عصاره‌ها، محاسبه و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در مواقع مصرف، این عصاره با آب مقطر رقیق شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷).

در این مطالعه تجربی، ۲۴ قطعه موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (با میانگین سنی ۸-۷ هفته) بررسی شدند. حیوانات در شرایط استاندارد (دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) در خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، پرورش و نگهداری شدند. در طول دوره تیمار، حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و شرایط پرورش برای تمامی حیوانات یکسان بود. همچنین اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی براساس ضوابط اخلاقی دانشگاه ارومیه رعایت گردید. در ادامه، موش‌ها به‌طور کاملاً تصادفی به چهار گروه آزمایشی تقسیم شدند.

پس از یک‌هفته انطباق با محیط مرکز نگهداری حیوانات، موش‌ها به‌طور تصادفی در ۴ گروه ۶ تایی قرارگرفتند. گروه اول (کنترل)، ۰/۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی را به‌صورت گاواژ دریافت کردند و به گروه دوم، سوم و چهارم هرکدام به ترتیب عصاره بومادران با دوز ۷۵ میلی‌گرم برکیلوگرم (دوز کم)، ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم (دوز متوسط) و ۳۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم (دوز زیاد)، به‌صورت گاواژ داده شد. تیمار به‌صورت روزانه و به مدت ۳۵ روز برای تمامی گروه‌ها ادامه داشت. یک‌روز پس از پایان تیمار، موش‌ها وزن شده، سپس به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی (Cervical dislocation)، آسان‌کشی شدند. پس از کالبدشکافی، بیضه‌ها با رعایت اصول استریل برداشته شده و متعاقب جداسازی بافت‌های اطراف، با استفاده از ترازو (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) وزن شدند. سپس دُم اپیدیدیم‌ها جدا شده و در داخل لوله فالکون‌های استریل حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت HTF (Human Tubular Fluid) حاوی ۴ میلی‌گرم به‌ازای هرمیلی‌لیتر از محیط کشت و آلبومین سرم گاوی (Bovine serum Albumin-BSA) قرار داده شدند. به‌منظور خارج‌شدن اسپرم‌ها از اپیدیدیم، دُم اپیدیدیم‌ها به قطعات کوچک بریده شد و سپس لوله فالکون‌ها در انکوباتور (LEEC, England) 5٪ CO_2 با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، بعد از ۶۰ دقیقه، قطعات بافتی از محیط کشت خارج شدند (۱۸).

در این مطالعه، جهت به دست آوردن اووسیت، به‌منظور بررسی درصد لقاح، رشد جنین‌ها و کیفیت رویان‌های حاصل از لقاح آزمایشگاهی، نیاز به تحریک تخمک‌گذاری در موش‌های ماده بود که به این شرح صورت گرفت:

ابتدا به موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ نژاد NMRI، ۷/۵ واحد بین‌المللی (IU) هورمون گنادوتروپین مادیان آبستن (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG) (شرکت فولیگون- هلند) به‌صورت داخل صفاقی تزریق شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت، هورمون گنادوتروپین جفت انسان (Human Chorionic Gonadotropin, HCG) (شرکت سیگما) به میزان ۷/۵ واحد بین‌المللی (IU)، به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید. ۱۲-۱۰ ساعت بعد از تزریق HCG (صبح روز بعد) (۱۹)، موش‌ها به روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند، سپس اوویداکت‌ها جدا شده و در داخل محیط کشت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و تخمک‌گیری به روش شکافتن (Dissecting) از ناحیه آمپول اوویداکت در زیر استریومیکروسکوپ (اولیمپوس، آمریکا) انجام شد. تخمک‌های به‌دست‌آمده پس از شست‌وشو، در داخل قطرات ۵۰۰ میکرولیتری محیط کشت لقاح در زیر روغن معدنی (Mineral oil, sigma) حاوی محیط کشت HTF محتوی BSA (۴ میلی‌گرم به‌ازای هرمیلی‌لیتر) گذاشته شدند. سپس اسپرم‌های جداشده مربوط به ۴ گروه آزمایشی، بعد از طی روند ظرفیت‌یابی (Capacitation)، به‌طور مجزا به تعداد یک‌میلیون به‌ازای هرمیلی‌لیتر محیط کشت اضافه شدند.

عمل لقاح حدود ۶-۴ ساعت بعد از اضافه‌کردن اسپرم صورت گرفت، سپس تعداد زیگوت‌های تشکیل‌شده در هرگروه، بررسی

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

و به‌صورت درصد لقاح بیان گردید (۱۸). جهت ارزیابی اثرات سه دوز مختلف عصاره بومادران بر روی باروری آزمایشگاهی و روند رشد جنینی بعد از لقاح، مراحل رشد جنینی در زیر میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان شکافتگی یا جنین‌های دو سلولی، ۲۴ ساعت بعد از کشت بررسی شدند و در هرگروه، جنین‌ها از نظر میزان فراگمانتاسیون در طی مراحل رشد با توجه به فاکتورهای مختلف نظیر لیزشدن جنین‌ها و وجود وزیکول‌های سیتوپلاسمی مقایسه شدند. کیفیت جنین‌ها و تعداد جنین‌های رشدکرده، درصد شکافتگی جنین‌های دو سلولی و درصد بلاستوسیست‌های ایجادشده در هرگروه ارزیابی شد.

در این مطالعه یافته‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند و سطح معنی‌داری، $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر، وزن بدن و بیضه در گروه دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری نداشت. در گروه چهارم نیز وزن بدن، اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نداشت، ولی وزن بیضه در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($p<۰/۰۵$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مقایسه اثر عصاره هیدروالکلی بومادران در سه دوز مختلف بر روی وزن بدن و بیضه در گروه‌های آزمایشی مختلف

گروه‌ها / متغیر	کنترل	دریافت‌کننده عصاره با دوز کم	دریافت‌کننده عصاره با دوز متوسط	دریافت‌کننده عصاره با دوز زیاد
وزن بدن (گرم)	۳۴/۶۷±۰/۷۳	۳۵/۵±۰/۳	۳۴/۸۳±۱/۱	۳۳/۸۳±۰/۳۳
وزن بیضه (میلی‌گرم)	۱۱۵±۰/۵۸	۱۱۶±۱	۱۱۵±۱	°۱۱۰/۳۳±۰/۳۳

***اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) با گروه‌های کنترل و دوز زیاد عصاره بومادران.**
نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

در گروه دریافت‌کننده دوز زیاد عصاره، درصد لقاح نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری از لحاظ آماری داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین مقایسه درصد جنین‌های دو سلولی ایجادشده که نشانگر شروع شکافتگی است، مشخص کرد تعداد این جنین‌ها در گروه دریافت‌کننده دوز زیاد عصاره نسبت به گروه کنترل، کاهش یافته، ولی این تفاوت معنی‌دار نیست.

تعداد بلاستوسیست‌ها نیز نشان‌دهنده روند رشد جنینی بود. در بررسی درصد جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند مشخص گردید اختلاف بین گروه‌های دریافت‌کننده دوز کم و متوسط عصاره، در مقایسه با گروه کنترل در این پارامتر، معنی‌دار نبوده است، ولی درصد بلاستوسیست‌ها درگروه دریافت‌کننده دوز زیاد عصاره، به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، کمتر بود ($p<۰/۰۵$) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: مقایسه میانگین درصد لقاح، جنین‌های دو سلولی و بلاستوسیست‌ها، متعاقب لقاح آزمایشگاهی اسپرم‌های حاصل از گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه‌ها / متغیر	کنترل	دریافت‌کننده عصاره با دوز کم	دریافت‌کننده عصاره با دوز متوسط	دریافت‌کننده عصاره با دوز زیاد
تعداد اووسیت	۱۱۷	۱۲۲	۱۲۵	۱۳۳
میزان لقاح (درصد)	۹۳/۰۳±۰/۷	۹۴/۹±۱/۲۵	۹۴/۵۱±۲/۳۶	۸۲/۱۲±۰/۶۴*
جنین‌های دو سلولی (درصد)	۸۵/۴۲±۲/۱	۹۱/۷۶±۰/۲۴	۹۱/۱۶±۲/۴۶	۷۶/۰۴±۱/۰۴
بلاستوسیست (درصد)	۷۶/۳۹±۱/۳۹	۸۰/۶۸±۰/۶۸	۷۹/۱۳±۱/۷۲	۵۵/۹۲±۰/۷۴**

***اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) با گروه‌های کنترل و دوز زیاد عصاره بومادران.**
****اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) با گروه‌های کنترل و دوز زیاد عصاره بومادران.**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

جنین‌های متوقف‌شده که برطبق میزان لیز و فراگمانتاسیون طبقه‌بندی شدند، در سه گروه، ارزیابی و با هم مقایسه شدند. تعداد کل جنین‌های متوقف‌شده در گروه دریافت‌کننده دوز زیاد عصاره، در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری داشت ($p<0/01$). در مورد جنین‌های متوقف‌شده نیز بین گروه دریافت‌کننده دوز زیاد عصاره و گروه کنترل از نظر درصد جنین‌های تیپ I (دارای بلاستومرهای لیز، فراگمانته و نکروتیک بودن کامل) و II (لیز و فراگمانته شدن در تعدادی از بلاستومرها)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت. در این گروه، درصد جنین‌های متوقف‌شده تیپ III (دارای تعداد کمی بلاستومرهای لیز، فراگمانته و وزیکول‌های سیتوپلاسمی)، تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت ($p<0/01$) (جدول شماره ۳) (شکل شماره ۲).

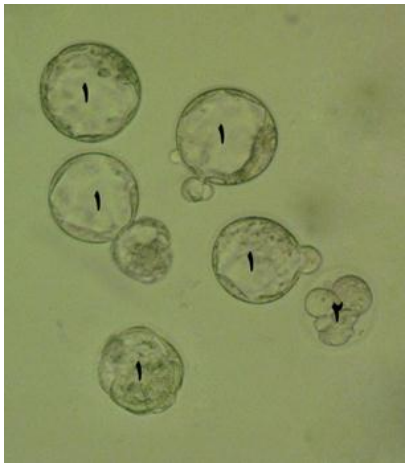
جدول شماره ۳: مقایسه میانگین نتایج حاصل از بررسی جنین‌های متوقف‌شده در گروه‌های مختلف آزمایشی

متغیر / گروه‌ها	کنترل	دریافت‌کننده عصاره با دوز کم	دریافت‌کننده عصاره با دوز متوسط	دریافت‌کننده عصاره با دوز زیاد
کل جنین‌های متوقف‌شده (درصد)	۲۳/۶۴±۱/۳۷	۱۹/۳۴±۰/۶۶	۲۰/۸۷±۱/۷۲	۴۴/۰۹±۰/۷۴**
جنین‌های متوقف‌شده تیپ I (درصد)	۱/۴۹±۰/۳	۱/۱±۰/۰۳	۱/۱۵±۰/۱	۴/۲۳±۰/۱**
جنین‌های متوقف‌شده تیپ II (درصد)	۲/۹۶±۰/۱۸	۲/۴۲±۰/۱	۲/۶۱±۰/۲۲	۷/۶۴±۰/۱۳***
جنین‌های متوقف‌شده تیپ III (درصد)	۱۹/۲±۱	۱۵/۸۵±۰/۵۵	۱۷/۱۱±۱/۴۴	۳۷/۶۲±۰/۶۲**

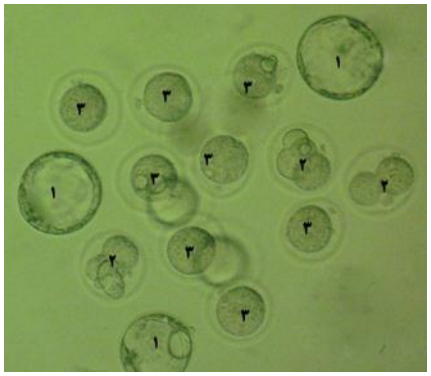
**اختلاف معنی‌دار ($p<0/01$) با گروه‌های کنترل و دوز زیاد عصاره بومادران.

***اختلاف معنی‌دار ($p<0/001$) با گروه‌های کنترل و دوز زیاد عصاره بومادران.

نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.



شکل شماره ۱: گروه کنترل، درصد بالایی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست (۱) رسیده و بلاستوسیست‌های حاصله، کیفیت مناسبی از نظر مورفولوژی دارند. همچنین یک جنین متوقف‌شده (۲) دیده می‌شود (استریو میکروسکوپ، بزرگنمایی ۲۰۰x).



شکل شماره ۲: گروه دریافت‌کننده دوز بالای عصاره، درصد بالایی از جنین‌ها در مراحل مختلف رشد متوقف شده‌اند (۲)، و تنها درصد کمی از جنین‌ها به مرحله بلاستوسیست (۱) رسیده‌اند و تعدادی از اووسیت‌ها (۳) بارورنشده نیز دیده می‌شوند (استریو میکروسکوپ، بزرگنمایی ۲۰۰x).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

بحث

استفاده از گیاهان دارویی و اثرات مفید آنها در درمان بسیاری از بیماری‌ها و کنترل آن، به‌طور چشمگیری گسترش یافته و شاخه‌ای از علوم دارویی نیز درخصوص گیاهان دارویی توسعه یافته است، اما هنوز در بسیاری از موارد، استفاده از گیاهان دارویی و یا ترکیبات فعال بیولوژیک، همچنین کاهش دوزهای مصرفی آنها و افزایش اثربخشی این ترکیبات، از موضوعات مهم تحقیقی است. در بسیاری از موارد، استفاده از داروهای گیاهی به دلیل مشخص‌نبودن مکانیسم اثر و دوز مؤثر استفاده از آنها در فارماکوپه کشورها رایج نشده است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد اثر عصاره هیدروالکلی بومادران کاملاً به‌صورت وابسته به دوز است؛ به‌نحوی‌که در دوز ۷۵ و ۱۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم تا حدودی تأثیر مثبت بر روی وزن بدن و بیضه، توان باروری آزمایشگاهی و روند رشد رویانی داشت که البته در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. احتمالاً بومادران با دارا بودن ترکیباتی ازجمله فلاونوئیدها، قادر به مهار آنزیم‌های دخیل در تولید رادیکال‌های آزاد است (۱۹). Esfandiari و همکاران در مطالعه خود، نقش مکمل‌های پروتئینی را در کاهش تولید ROS و در نتیجه افزایش میزان لقاح و بهبود توانایی تکاملی جنین نشان دادند (۲۰). Wang و همکاران نیز گزارش کردند افزودن آنتی‌اکسیدان‌ها، نسبت تکوین بلاستوسیست را در جنین‌های موش بهبود می‌بخشد (۲۱). Catt و همکاران نشان دادند استفاده از آنتی‌اکسیدانت در محیط کشت باعث بهبود نسبت باروری و افزایش لانه گزینی می‌شود (۲۲). در همین راستا، گزارشهای دیگری نیز بر نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در کاهش آسیب DNA و آپوپتوز در اسپرم‌ها، همچنین افزایش میزان بارداری و لانه‌گزینی بالینی صحه گذارده‌اند (۲۳). نتایج برخی از مطالعات، اثرات سوء گیاهان دارویی مانند گیاه بومادران را بر سیستم‌های مختلف بدن ازجمله دستگاه تناسلی نر و ماده نشان داده‌اند (۲۴). در مطالعه حاضر، عصاره هیدروالکلی بومادران (دوز ۳۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم) اثر توکسیک داشت و سبب کاهش معنی‌دار در وزن بدن و بیضه، توان باروری آزمایشگاهی و روند رشد جنینی شد.

مکانیسم دقیق اثرات کاهنده میزان باروری گل بومادران در موش نر هنوز مشخص نیست، ولی ممکن است این اثرات مربوط به حضور ماده‌ای به نام فلاون در این گیاه باشد که فلاون به گیرنده‌های مربوط به هورمون‌های جنسی متصل شده و با افزایش فعالیت سیستم آدنیلات سیکلاز، تولید هورمون‌های جنسی را متوقف می‌کند (۲۵). همچنین این گیاه سرشار از ماده‌ای به‌نام آپیژنین بوده که محرک تولید آنزیم‌های مرگ سلولی است (۲۶). Innocenti و همکاران گزارش کردند تأثیرات سمی عصاره بومادران اغلب وابسته به دوز است (۲۷). براساس مطالعه Parandin و همکاران، عصاره گل بومادران در دوز بالا (۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم)، شانس باروری را در موش‌های صحرایی نر کاهش می‌دهد (۲۸). Kryshchy و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند عصاره گیاه بومادران (به میزان ۱/۲ گرم به‌ازای هرکیلوگرم وزن بدن) می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب ضدباروری با اثرات برگشت‌پذیر در جنس نر معرفی گردد؛ یعنی به مرور زمان، اثرات عصاره از بین رفته و سلول‌های آسیب‌دیده ترمیم می‌شوند (۲۹). براساس مطالعه Jalali Nadoushan و همکاران، عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران (به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، اثرات توکسیک بر روی سلول‌های زایگر بیضه اعمال می‌کند (۳۰).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج مطالعه حاضر، اثرات عصاره هیدروالکلی بومادران به‌صورت وابسته به دوز است؛ به‌نحوی‌که در دوز کم و متوسط، درصد باروری را در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی افزایش می‌دهد که البته در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نیست ولی در دوز بالا، میزان باروری و روند رشد جنین را در این حیوانات به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارشناس محترم بخش بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، جناب آقای علی کریمی، نهایت سپاس و قدردانی را به عمل می‌آوریم.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

References:

1. de Lamirande E, Leduc BE, Iwasaki A, Hassouna M, Gagnon C. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. Fertil Steril 1995;63(3):637-42.

2. Aitken J, Krausz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. Mol Reprod Dev 1994;39(3):268-79.

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

4. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. Curr Med Chem 2001;8(7):851-62.

5. Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. Mol Cell Endocrinol 2004;216(1-2):31-9.

6. Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. J Androl 1996;17(2):151-7.

7. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in the semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma. Int J Androl 1993;16(3):183-8.

8. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. Indian J Med Res 2009;129(4):357-67.

9. Agarwal A, Prabhakaran SA, Sikka SC. Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: Evidence-based analysis. Am J Reprod Immunol 2008;59:2–11.

10. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D, Manicardi G, Bianchi PG, ShoukirY, et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: Effect on fertilization and embryo development. Hum Reprod 1998;13 Suppl 4:11-9.

11. Bader A, Flamini G, Cioni PL, Morelli L. Essential oil composition of Achillea santolina L. and Achillea biebersteinii Afan. Collectedin Jordan. Flavour Frag J 2003;18(1):36-8.

12. Nemeth E, Bernath J. Biological activities of yarrow species (Achillea spp). Curr Pharm Design 2008;14(29);3151-67.

13. Al-Hindawi MK, Al-Deen IH, Nabi MH, Ismail MA. Anti-inflammatory activity of someIraqi plants using intact rats. J Ethnopharmacol 1989;26(2):163-8.

14. Shalizar Jalali A, Hasanzadeh Sh, Malekinejad H. Beneficial effects of Achillea millefolium aqueos extract against cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. J Exp Integr Med 2013;3(2):113-19.

15. Akbarizadeh Z, Najafi Gh, Farokhi F. Effect of aquatic extract of Achillea millefolium on sperm and in vitro fertilization in adult rats treated with cyclosporine A. J Zabol Univ Med Sci 2013;4(3):9-18. [Full Text in Persian]

16. Montanari T, De Carvalho JE, Dolder H. Antispermatogenic effect of Achillea millefolium L. Contraception 1998;58(5):309-13.

17. Porter NG, Lammerink JP. Effect of temperature on the relative densities of essential oils and water. J Essent Oil Res 1994;6(3):269-77.

18. Ebadi Manas Gh, Hasanzadeh Sh, Najafi GR, Parivar K. The effects of pyridaben pesticide on the DNA integrity of sperms and early in vitro embryonic development in mic. Iran J Reprod Med 2013;11(8):605–10.

19. Roghani M, Baluchnejad Mojarad T. Antinociceptive effect of Allium schoenoprasum L. oral feeding in male diabetic rats. J Shahrekord Univ Med Sci 2009;12(4):64-70. [Full Text in Persian]

20. Esfandiari N, Falcone T, Agarwal A, Attaran M, Nelson DR, Sharma RK. Protein supplementation and the incidence of apoptosis and oxidative stress in mouse embryos. Obstet Gynecol 2005;105(3):653-60.

21. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin Esupplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. Fertil Steril 2002;78(6):1272-7.

22. Catt JW, Henman M. Toxic effects of oxygen on human embryo development. Hum Reprod 2000;15 (Suppl 2):199-206.

23. Hughes CM, Lewis SE, Mc Kelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. Hum Reprod 1998;13(5):1240-7.

24. Dalsenter PR, Cavalcanti AM, Andrade AJ, Araújo SL, Marques MC. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of Achillea millefolium L. (Asteraceae) in Wistar rats. Reprod Toxicol 2004;18(6):819-23.

25. Jeong HJ, Shin YG, Kim IH, Pezzuto JM. Inhibition of aromatase activity by flavonoids. Arch Pharm Res 1999;22(3):309-12.

26. Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK. Induction of apoptosis by apigenin andrelated flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. Eur J Cancer 1999;35(10):1517-25.

27. Innocenti G, Vegeto E, Dall' Acqua S, Ciana P, Giorgetti M, Agradi E, et al. In vitro estrogenic activity of Achillea millefolium L. Phytomedicine 2007;14(2-3):147-52.

28. Parandin R, Ghorbani R, Sadeghipour Roodsari HR. Effects of alcoholic extract of achillea millefolium flowers on fertility parameters in male rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2011;19(1):84-93. [Full Text in Persian]

29. Kryshchy P, Parivar K, Haeri Rohani A, Roustaiyan AH. The effect of Achillea millefolium L. extract on spermatogenesis and hormone-pituitary-gonadal axis in Balb/C mice. J Lorestan Univ Med Sci 2004;22:13-18. [Full Text in Persian]

30. Jalali Nadoushan MR, Ghosian Moghaddam MH, Chegini V, Jafari H, Zaeri F. Evalution of antispermatogenic of Yarrow in mice. Zahedan J Res Med Sci 2008;10(3):219-25. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

Original Article

The Effects of Hydroalcoholic Extract of Achillea millefolium on In Vitro Fertilization (IVF) and Embryonic Development Process in Mice

Neda Asliranifam[1], Shapour Hasanzadeh[2], Gholamreza Najafi[2]*

[1]*Young Researchers & Elite Club, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.*

[2]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Neda Asliranifam,** Young Researchers & Elite Club, Urmia branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

Email: n.iranifam@yahoo.com

Received: 1 Jan, 2016

Accepted: 28 Feb, 2016

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 14:40 IRDT on Tuesday May 30th 2017

Abstract

Background and Objectives: *Achillea millefolium* Inflorescences (AMI) is one of the oldest and most well-known medicinal plants with potential antioxidant properties. This study aimed to investigate the effects of three different doses of hydroalcoholic extract of AMI on *in vitro* fertilization and embryonic development process in mice.

Methods: Twenty-four male white laboratory NMRI mice were randomly divided into 4 groups: Group 1 received normal saline (0.1 ml/kg); group 2, 3, and 4 received hydroalcoholic extract of AMI at doses of 75, 150, and 300mg/kg, respectively. Treatment were continued for 35 days. At the end, the mice were euthanized by cervical dislocation, Cauda Epididymis were used to collect sperms, and rate of *in vitro* fertilization and embryonic development were examined in all groups. Data analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey post-hoc tests.

Results: In the groups receiving low and medium doses of AMI extract, fertilization rate and the number of blastocysts increased and the number of arrested embryos was reduced, which was not significant compared to the control group. But in the group receiving high dose of the extract, fertilization rate and the number of blastocysts decreased ($p<0.05$) and the number of arrested embryos significantly increased compared to the control group ($p<0.01$).

Conclusion: According to the results of this study, hydroalcoholic extract of AMI has a dose-dependent manner, so that at low and medium doses had no significant effect, but at high dose reduced *in vitro* fertilization and embryos development.

Keywords: *Achillea*; Fertilization in vitro; Mice.