

اثر آنتی اسپرماتوژنز عصاره گیاه بومادران

بررسی اثر آنتی اسپرماتوژنز عصاره گیاه بومادران

Achillea Millefolium L در موش سوری

دکتر محمد رضا جلالی ندوشن*، دکتر محمد حسن قوسیان مقدم**

دکتر ویکتوریا چگینی***، دکتر حسین جعفری****، دکتر فرید زایری*****

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۱۲/۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۷/۱۸

* دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه پاتولوژی

** دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

*** پزشک عمومی، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی

**** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

***** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه آمار زیستی

چکیده

زمینه و هدف: یکی از اولویت های مهم در کشورهای در حال توسعه کنترل جمعیت می باشد. با توجه به اینکه داروهای پیشگیری کننده از بارداری تنها برای خانمها موجود می باشد، مطالعه جهت کشف داروهایی که بتواند بر روند اسپرماتوژنز در مردان موثر باشد حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره گیاه بومادران *Achillea Millefolium L.* بر روند اسپرماتوژنز در موش های سوری بود.

مواد و روش کار: تعداد ۲۵ موش در ۵ گروه ۵ تایی با عصاره اتانولی، عصاره هیدروالکلی، گروه شم برای هر دو گروه فوق و یک گروه کنترل بدون درمان مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تکمیل دوره درمان بیضه حیوانات مورد مطالعه هیستوپاتولوژی از نظر وجود سلولهای دژنره، سلولهای غول آسا، اسپرماتوژنز در توبولهای مختلف و بهم ریختگی ساختمانی قرار گرفت. همچنین اختلاف وزن حیوان قبل و بعد از مطالعه، و اندکس وزن گناد نیز در گروههای مختلف بررسی شد.

یافته ها: گروههای مورد مطالعه از نظر یافته های میکروسکوپی بصورت کمی اختلاف معنی داری داشتند ($P < 0.05$) ولی توقف کامل اسپرماتوژنز در هیچکدام از گروهها مشاهده نشد. اختلاف وزن بدن و اندکس وزن گناد در گروههای مختلف معنی دار نبود.

نتیجه گیری: اگرچه اختلاف کمی یافته های میکروسکوپی در بین گروههای مختلف معنی دار می باشد ولی با توجه به عدم توقف کامل اسپرماتوژنز در مورد اثر ضد بارداری این گیاه نمی توان نتیجه قطعی گرفت. (مجله طبیب شرق، دوره ۱۰، شماره ۳، پائیز ۱۳۸۷، ص ۲۱۹ تا ۲۲۵)

کلیدواژه ها: اسپرماتوژنز، بومادران، بیضه، عصاره، موش

مقدمه

از بارداری برای مردان نیز وجود داشته باشد. در طب سنتی کشورهای مختلف، داروهای متعددی برای پیشگیری از بارداری وجود دارد یکی از این موارد، گیاه دارویی بومادران (*Yarrow*) *Achillea Millefolium L.* است. این گیاه بیش از ۳۰۰۰ سال است که استفاده دارویی دارد و ترکیبات اصلی آن شامل کافور Myrcen، سینئول، کاریوفیلن و لینالول می باشد.^(۲،۱) این گیاه بیشتر بعنوان داروی ضد خونریزی، محرک ترمیم، درمان

کنترل جمعیت به وسیله روشهای پیشگیری از بارداری یکی از مسائل مهم جوامع امروز به خصوص در کشورهای در حال توسعه می باشد. در حال حاضر روشهای دارویی مطرح برای پیشگیری قطعی از بارداری، استفاده دارو توسط خانمهاست. با توجه به نقشی که هر دو جنس در کنترل جمعیت می توانند داشته باشند و از آنجا که در بعضی موارد به دلایلی منع استفاده دارو در زنان وجود دارد لازم است روشهای دارویی پیشگیری

اتاق بادستگاه سوکسله عصاره گیری شد. عصاره الکلی تهیه شده در دمای اتاق در (Sigma) Tween 20 بصورت سوسپانسیون درآمده و در سالیان ۰/۱۵mol/L رقیق شد.^(۹) (ب) عصاره هیدروالکلی: در دمای اتاق ۱۰۰ گرم از پودر گل بومادران با ۸۰۰ میلی لیتر از اتانول ۸۰٪ با حرکت دائمی در درجه حرارت اتاق بمدت ۷۲ ساعت بادستگاه سوکسله عصاره گیری شد. عصاره هیدروالکلی در (Sigma) Tween 80 بصورت سوسپانسیون درآمده و در آب مقطر رقیق شد.^(۹) هر دو نوع عصاره در دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ گردیدند. به منظور بررسی آثار بیولوژیک عصاره گیاه و تزریق آن به حیوانات ابتدا LD50 (Lethal dose) تعیین گردید و با کاهش آن مقدار دوز آستانه ای مشخص گردید. به منظور محاسبه دوزی از عصاره که در ۵۰ درصد حیوانات مورد مطالعه اثر کشندگی داشته باشد از برنامه کامپیوتری PCS و بر اساس روش ویلکوسن - لیچفیلد استفاده شد^(۱۱)

نحوه تجویز گروه اول: عصاره الکلی Tween 20 با دوز ۲۰۰mg/kg روزانه به صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۲۰ روز تجویز گردید.^(۹) گروه دوم: فقط حلال با همان مقدار گروه یک در مدت مشابه بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه سوم: عصاره هیدروالکلی با دوز ۳۰۰mg/kg روزانه به صورت خوراکی به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. گروه چهارم: فقط حلال Tween 80 را بصورت خوراکی مشابه با گروه سوم دریافت کردند و گروه پنجم: بعنوان گروه کنترل هیچ ترکیبی دریافت نکردند.

حیوانات قبل از شروع و بعد از پایان درمان وزن شدند. دو هفته پس از پایان درمان تمام حیوانات بوسیله اتر بیهوش شده و گنادها (هر دو بیضه) از نسوج اطراف جدا شده و از بدن خارج و وزن گردیدند سپس اندکس وزن بیضه بوسیله فرمول زیر محاسبه گردید^(۶):

$$\text{وزن بیضه} \\ 100 \times \frac{\text{اندکس وزن بیضه}}{\text{وزن حیوان}}$$

زخم، مسکن و اسپاسمولیتیک، مصرف می شده است^(۳-۵) همچنین برای یکی از مشتقات آن خواص ضد توموری گزارش شده است.^(۶) قبایل سنتی اروپای شمالی و آمریکای شمالی آن را بعنوان داروی پیشگیری از بارداری، محرک سقط و محرک قاعدگی مورد استفاده قرار می دادند.^(۷) اثر این گیاه بر روی باروری و اسپرماتوژنز در چند مطالعه بررسی شده است اما نتایج متناقضی گزارش شده است.^(۷-۹) مطالعات فیتوشیمیایی مختلف اجزا تشکیل دهنده این گیاه را مشخص نموده اند اما فقط چند مطالعه ارتباط این ترکیبات را با فعالیتهای فارماکولوژیک به اثبات رسانده است.^(۴) علی رغم اینکه سازمان دارو و غذایی آمریکا این گیاه را غیرسمی معرفی کرده است^(۴) اما بعضی اثرات سمی آن در انسان و حیوانات گزارش شده است. اثرات سمی گزارش شده در انسان شامل درماتیت تماسی، سردرد و سرگیجه می باشد.^(۴ و ۱۰)

بر این اساس در این مطالعه اثر عصاره گیاه بومادران بر روند اسپرماتوژنز و تغییرات کمی در سلولهای زایگر بیضه مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

موشهای نر بالغ نژاد Swiss Albin به تعداد ۲۵ رأس به وزن متوسط ۲۵ گرم از موسسه تحقیقاتی رازی کرج تهیه شد و با در نظر گرفتن پروتکل های اخلاق در پژوهش حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده پزشکی شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات بصورت تصادفی در ۵ گروه بطور مساوی تقسیم شدند محل نگهداری حیوانات درجه حرارت ۲۵°C داشته و محیط اتاق ۱۲ ساعت روشن و ۱۲ ساعت تاریک بود. حیوانات از آب شهر و غذای مخصوص استفاده می کردند.

گیاه مورد مطالعه گل بومادران آسیاب شده بود که به روشهای زیر برای مطالعه در گروههای مختلف عصاره گیری و آماده گردید^(۶):

الف) عصاره اتانولی: ۵۰ گرم از پودر گل بومادران با ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ با حرکت مداوم بمدت ۷۲ ساعت در دمای

توکی اختلاف معنی داری وجود نداشت به عبارتی این دو عصاره اثرشان با یکدیگر مشابه و با سایر گروهها متفاوت بود. درصد توبولهای دارای اسپرم بالغ با آماره ANOVA در گروههای مختلف تفاوت معنی داری داشت ($P=0/001$) که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.

در نمای میکروسکوپی گناد در هر گروه اختلاف واضح بین توبولهای مختلف وجود داشت یا به عبارتی همه توبولها بصورت یکسان تحت تأثیر عصاره گیاه قرار نگرفته بودند و بصورت کلی در هیچ کدام نمونه‌های مورد مطالعه توقف کامل اسپرما توژنز و عدم وجود اسپرم بالغ را نشان ندادند.

سپس گنادها برای بررسی پاتولوژی در محلول بوئن قرار گرفته و پس از فیکساسیون در فرمالین بافره ۱۰٪ به روش روتین هیستوپاتولوژی با دستگاه Tissue processor آماده سازی (Processing) شده از هر نمونه برشهای متعدد ۵ میکرونی به وسیله دستگاه میکروتوم تهیه و به روش روتین با هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شد و نمونه ها به وسیله میکروسکپ نوری Zeiss مدل Standard 20 در بزرگنمایی ۴۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. متوسط تعداد سلولهای دژنره و غول آسا در هر توبول پس از مشاهده حداقل ۵۰ توبول تعیین گردید همچنین درصد توبولهای دارای اسپرم بالغ و توبولهایی که بهم ریختگی ساختمانی (Dysorganization) داشتند بوسیله شمارش ۱۰۰ توبول تعیین گردید.

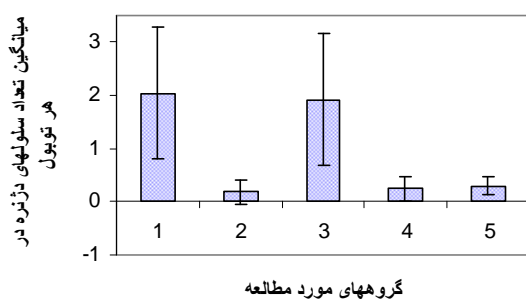
اطلاعات حاصله شامل اختلاف وزن حیوان در گروههای مختلف قبل و بعد از درمان، تعداد متوسط سلولهای دژنره و غول آسا، درصد توبولهای دارای اسپرم بالغ و بهم ریختگی ساختمانی، و اندکس وزن بیضه برای هر گروه گزارش شد. به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروهها از آزمون ANOVA و آزمون توکی استفاده شد و حد خطای $P<0.05$ به لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

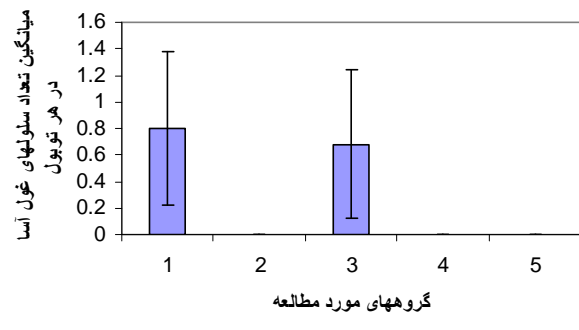
یافته‌های مربوط به اختلاف وزن حیوانات قبل و بعد از مطالعه و اندکس وزن گناد در گروههای مختلف در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

از نظر دو یافته ماکروسکوپی (اختلاف وزن قبل و بعد از مطالعه، و اندکس وزن گناد بعد از مطالعه) اختلاف بین گروههای مختلف با تست آماری آنالیز واریانس (ANOVA) معنی دار نبود. اختلاف متوسط تعداد سلولهای دژنره در هر توبول منی ساز ($P=0/001$) و متوسط تعداد سلولهای غول آسا در هر توبول در گروههای مختلف بوسیله آماره ANOVA معنی دار بود ($P=0/002$) (نمودار ۱ و ۲). بین عصاره اتانولی و هیدرو الکلی از نظر یافته های ماکروسکوپی با استفاده از تست

نمودار 1: میانگین تعداد سلولهای دژنره در هر توبول در گروههای مختلف مورد مطالعه



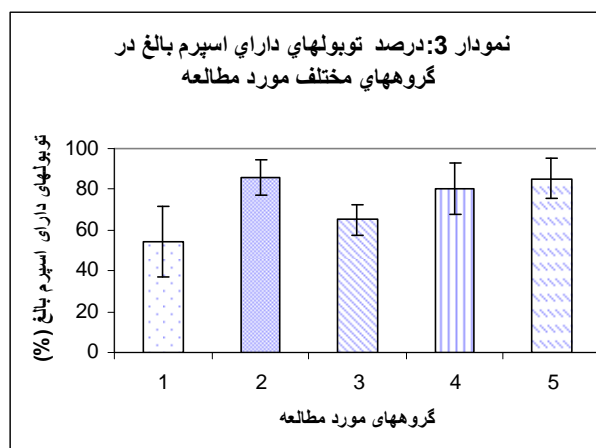
نمودار 2: میانگین تعداد سلولهای غول آسا در هر توبول در گروههای مختلف مورد مطالعه



همچون یافته های مطالعات تجربی دیگر با استفاده از موادی مثل ۵- آمینوایندازول،^(۱۲) گوسیپول^(۱۳) و *Trypterygium wilfordii*^(۱۴) در مطالعه ما نیز دژنراسیون و مرگ سلولی در نمای میکروسکوپی گنادها قابل مشاهده است که بیانگر اثرات آنتی اسپرماتوژنیک بومادران و این مواد می باشد. مطالعات فوق بصورت کیفی این یافته را بررسی نمودند ولی در مطالعه ما این یافته بصورت کمی بررسی شده است. وجود سلولهای غول آسا که فقط در گروههای تحت درمان با بومادران مشاهده شده است نیز بیانگر اثرات گیاه بومادران بر روی سلولهای زایگر می باشد. ایجاد سلولهای غول آسا در مطالعات دیگری که با استفاده از پروپیونات تستوسترون^(۱۵) و ۵- تیو-D- گلوکز^(۱۶) انجام گرفته نیز دیده شده است که احتمالاً این اثر بوسیله دخالت بعضی از سیتوکینها ایجاد می گردد. نکته قوت مطالعه ما بررسی این یافته میکروسکوپی بصورت کمی و مشاهده اختلاف آن در گروههای مختلف است. هر دو اثر دژنراسیون و ایجاد سلول غول آسا در مطالعه مشابه دیگری که بوسیله *Montanari T* انجام شده نیز مشاهده گردیده است.^(۹) ولی این محقق این اثرات را تنها بصورت کیفی بررسی نموده است.

در مطالعه *Dalsenter* که بر روی موش صحرایی انجام شده اگر چه بررسی هیستولوژیک انجام نشده ولی شمارش اسپرم و اشکال غیر طبیعی بررسی شده اند. در این مطالعه گرچه اختلاف معنی داری بین گروه کنترل و درمان وجود نداشته ولی درصد اشکال غیر طبیعی بین دو گروه اختلاف معنی داری داشته است^(۱۷) که به نوعی تأیید کننده مطالعه ما می باشد که در گروههای درمان شده اسپرم بالغ در بسیاری از توبولها دیده می شود و در صورت آنالیز اسپرم ممکن است شمارش طبیعی را نشان دهد همچنین مشاهده اشکال غیر طبیعی موجود در توبولها با مطالعه *Dalsenter* مطابقت دارد

اما یافته مهمی که استفاده از بومادران را در حال حاضر به عنوان یک ماده دارای خاصیت آنتی اسپرماتوژن مورد سؤال قرار می دهد یکسان نبودن اثر آن در توبولهای مختلف می باشد



جدول ۱: یافته های مربوط به افتلاف وزن بدن و اندکس وزن گناد،

در گروههای مختلف مورد مطالعه

گروهها	یافته ها	اختلاف وزن قبل و بعد از مطالعه (گرم)	اندکس وزن گناد (گرم)
اول		۶/۰±۱/۱۶	۳۰۶/۶۰±۱۴/۳۲
دوم		۶/۲۸±۱/۳۹	۳۰۴/۰۰±۱۴/۱۹
سوم		۶/۷۰±۲/۱۸	۳۰۲/۸۰±۱۰/۶۵
چهارم		۷/۹۴±۳/۷۸	۳۰۵/۸۰±۱۶/۲۵
پنجم		۴/۳۲±۱/۰۷	۳۰۴/۶۸±۱۶/۰۱

بحث

یافته های این مطالعه نشانگر تاثیر عصاره گیاه بو مادران بر افزایش متوسط تعداد سلولهای دژنره و سلولهای غول آسا در هر توبول و کاهش اسپرماتوژنز در این توبولها است. این یافته ها را می توان به سه دسته یافته های مربوط به اختلاف وزن و اندکس وزن گناد، میکروسکوپی کمی و میکروسکوپی کیفی تقسیم کرد.

در مورد اختلاف وزن بدن و اندکس وزن گناد نتیجه مشابهی توسط *Montanari T* گرفته شده است و این نکته بیانگر این می باشد که تغییرات ایجاد شده در گنادها در سطح سلولی بوده و اندکس وزن گناد و وزن بدن تحت تأثیر عصاره نمی باشد.^(۹) در مطالعه دیگری که توسط *Cavalcanti* و همکاران بر روی موش صحرایی *Rat* صورت گرفته نیز اختلاف معنی داری بین وزن حیوانات دریافت کننده داروی بومادران و گروه کنترل دیده نشده که این مطلب با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد.^(۴)

نمی‌گردد و لازم است مطالعات کاملتری برای رد یا اثبات اثر آن در پیشگیری از بارداری صورت پذیرد ولی این مطالعه می‌تواند بیانگر اثرات توکسیک این گیاه دارویی بر روی سلولهای زایگر بیضه باشد.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجویی جهت اخذ دکترای حرفه ای پزشکی خانم ویکتوریا چگینی می باشد که طرحنامه آن در شورای پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد به تصویب رسیده است.

بطوریکه در بعضی از توبولها اسپرم بالغ به تعداد زیاد بعد از دوره درمانی وجود دارد و از آنجا که این اسپرمهای بالغ حتی در تعداد کم می‌توانند موجب باروری شوند در حال حاضر نمی‌توان اثر قطعی پیشگیری از بارداری را برای این گیاه دارویی عنوان کرد. همین نتیجه از مطالعه مشابه دیگری که توسط Montanari T انجام شده به دست آمده است.

اگرچه این مطالعه اثرات گیاه بومادران را بر روی اسپرماتوژنز نشان داده است ولی بعلاوه اثر غیریکسان آن بر روی توبولهای منی‌ساز و وجود اسپرم بالغ بعد از دوره درمانی در حال حاضر بعنوان یک ماده مؤثر برای پیشگیری از بارداری توصیه

References

1. Innocenti G, Vegeto E, Dall'Acqua S, et al. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. *Phytomedicine* 2007; 14:147-152
2. Mitich LW. Intriguing world of weeds Yarrow-the herb of Achilles. *Weed Technology* 1990;4:451-453.
3. Chandler RF, Hooper SN, Harvey MJ. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea Millefolium*, Compositae. *Econ Bot* 1982; 36:203-223.
4. Cavalcanti AM, Baggio CH, Freitas CS, et al. Safety and antiulcer efficacy studies of *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. *J Ethnopharmacol* 2006 19; 107(2):277-284.
5. Benedek B, Kopp B, Melzig MF. *Achillea millefolium* L. is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? *J Ethnopharmacol* 2007; 113(2):312-317
6. Tozyo T, Yoshimura Y, Sakurai K, et al. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1994; 42(5):1096-1100.
7. De Laszlo H, Henshaw PS. Plant materials used by primitive peoples to affect fertility. *Science* 1954;119(3097):626-631.
8. Barnes CS, Price JR, Hughes RL. An examination of some reputed antifertility plants. *Lloydia* 1975; 38:135-140.
9. Montanari T, de Carvalho JE, Dolder H. Antispermatic effect of *Achillea millefolium* L. in mice. *Contraception* 1998; 58:309-313.
10. Hausen BM, Breuer J, Weglewski J, et al. alpha-Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from yarrow (*Achillea millefolium* L., Compositae). *Contact Dermatitis* 1991; 24(4):274-280.

11. Mali PC, Ansari AS, Chaturvedi M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. *J Ethnopharmacol* 2002;82:61-67
12. Lobl TJ, Porteus SE. Antispermatogenic effects of 5-aminoindazole in rats. *J Reprod Fertil* 1977; 50(2):371-372.
13. Haider SG, Passia D, Chen KQ, et al. Reversible changes in rat spermatogenesis induced by an antifertility substance (Gossypol). A histochemical report. *Acta Histochem* 1985; 77(2):185-191.
14. Qian SZ, Zhong CQ, Xu Y. Effect of *tripterigium wilfordii* Hook. F. on the fertility of rats. *Contraception* 1986; 33(2):105-110.
15. Abdi SHM, Hasan W. Effect of testosterone on the histological structure of the testis of adult albino rats. *Indian J Med Res* 1973; 61:1207-211.
16. Majumdar SK, Udelsman R. Fine structure of mouse testes following intraperitoneal treatment with 5-thio-D-glucose. *J Heredity* 1979; 70:194-198.
17. Dalsenter PR, Cavalcanti AM, Andrade AJ, et al. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. *Reproduc Toxicol* 2004; 18:819-823.

Evaluation of Antispermatic Effects of Yarrow in Mice

Jalali Nadoushan MR, PhD*; Ghosian Moghaddam MH, PhD*;
Chegini V, MD*; Jafari H, PhD*; Zaeri F, PhD*

Received: 22/Feb/2008

Accepted: 9/Oct/2008

Background: Male contraception is necessary for control of population growth in developing countries. There are several methods for contraception in females but there is no definite method for males. In this study, we evaluated the effects of yarrow extract on spermatogenesis in Suri mice.

Materials and Methods: Twenty five mice were divided into 5 groups. They were treated by ethanolic extract, hydroalcoholic extract, sham groups for them and control group. After treatment period, their testes were studied histologically. Degenerated cells, giant cells, complete spermatogenesis in different tubules and disorganization were evaluated. Difference between pretest and posttest body weight and gonadal weight index were also evaluated.

Results: There were statistically significant difference between groups for degenerated cells, giant cells, complete spermatogenesis in different tubules and disorganization ($P < 0.05$). The difference between pretest and posttest body weight and gonadal weight index were not statistically significant. No complete maturation arrest was noted in the specimens.

Conclusion: Although a quantitative difference was noted between groups, but we cannot recommend yarrow for male contraception, because it could not stop spermatogenesis completely.

KEY WORDS: Spermatogenesis, Yarrow, Testis, Extract, Mice

*Dept of Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

** Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

*** Faculty of Medicine, Shahed University

**** Dept of Pharmacology, Faculty of medicine, Qazvin University of Medical Sciences and Health Services, Qazvin, Iran.

***** Dept of Biostatistics Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.