

اثر عصاره توتال میوه گیاه پنج انگشت بر اسپرماٹوزنز موش نژاد بالب سی

چکیده:

مقدمه و هدف: پنج انگشت یا ویتکس یک گیاه فیتواستروژن بومی خاورمیانه و جنوب اروپا است و در بسیاری از کشورها مصرف پزشکی دارد. هدف از این تحقیق بررسی اثرات عصاره میوه گیاه ویتکس بر اسپرماٹوزنز موش نر می باشد.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی می باشد که طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۶ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان انجام شد. در مجموع تعداد ۵۶ موش نر بالغ به ۳ گروه، کنترل، شام، تجربی (۶۵، ۱۶۵، ۲۶۵، ۳۶۵ و ۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره دانه گیاه) تقسیم شدند. در حیوانات روزانه به مدت ۱۰ روز متوالی به صورت درون صفاقی تزریق انجام شد و دو هفته پس از آخرین تزریق به وسیله قطع نخاع کشته شدند و بیضه و اپیدیدیم چپ آنها برداشته شد. بخش دمی اپیدیدیم راست برای شمارش اسپرم به کار رفت. پس از بررسی ماکروسکوپی (وزن، قطر بزرگ، کوچک و حجم بیضه) بافت‌ها در فیکساتیو بوئن فیکس شدند. مقاطع ۵ میکرومتری تهیه و با هماتوکسیلین - ائوزین رنگ شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و توکی تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: در این بررسی تفاوت معنی‌داری در وزن بدن، حجم، وزن و قطر بیضه مشاهده نشد. مطالعات میکروسکوپی نوری کاهش معنی‌داری در اپیتلیوم زاینده در دوزهای ۲۶۵ و ۳۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ($P < 0.05$) و همچنین افزایش بافت بینابینی در دوزهای ۲۶۵، ۳۶۵ و ۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم را نشان داد ($P < 0.001$). تفاوت معنی‌داری در ضخامت اپی‌تلیوم و قطر اپیدیدیم نبود. سلول‌های زاینده هسته پیکنوتیک و لوله‌های سمینفر حفره‌های فراوانی داشتند که در لوله‌ها پخش شده بود. همچنین در بیضه یک بی نظمی عمومی در قسمت‌های مختلف بافت زاینده و لوله‌های سمینفر مشاهده شد. نتایج شمارش اسپرمی کاهش معنی‌دار اسپرم را در دوز ۲۶۵ و ۳۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نشان داد ($P < 0.01$).

نتیجه‌گیری: ویتکس دارای روغن‌های ضروری، گلیکوزیدهای ابریدوئید، فلاونوئیدهای دی‌ترپن و اسیدهای چرب ضروری است. به نظر می‌آید اثرات ضد باروری آن وابسته به فلاونوئید و اسیدهای چرب ضروری باشد، اما مطالعات بیشتری باید روی فارماکوکینتیک این گیاه انجام شود.

واژه‌های کلیدی: پنج انگشت، گناد نر، اسپرماٹوزنز، موش

دکتر مینا رضانی*

دکتر سیمای نصری**

دکتر حسین بهادران***

*دکترای زیست‌شناسی سلولی و تکوینی، استادیار
دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان، دانشکده علوم،
گروه زیست‌شناسی

**دکترای فیزیولوژی، استادیار دانشگاه پیام

نور مرکز تهران، دانشکده علوم، گروه
زیست‌شناسی

***دکترای آناتومی و علوم تشریح، استادیار

دانشگاه علوم پزشکی بقیه اعجاز (عج)، دانشکده
پزشکی، گروه علوم تشریح

تاریخ وصول: ۱۳۸۷/۹/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۲/۱۹

مؤلف مسئول: مینا رضانی

پست الکترونیک: Mina.ramezani@gmail.com

مقدمه

شده و آزادی پرولاکتین را مهار می‌کند و به این صورت علایم سندرم قبل از قاعدگی را کاهش می‌دهد(۶). هم اکنون عصاره پنج انگشت در سراسر اروپا و آمریکای شمالی استفاده می‌شود(۷). در ایران نیز با نام گیاه زنان یا ویتکس، برای رفع اختلالات قاعدگی تجویز می‌شود. گزارش شده است که مصرف آن در بارداری مؤثر است و از سقط جنین جلوگیری می‌کند، اما توصیه می‌شود که در حین حاملگی استفاده نشود(۸). همچنین مطالعه‌های مختلف، اثر ضد سرطان، جلوگیری از پوکی استخوان و پایین آورنده کلسترول خون آن را نشان داده است(۹ و ۱۰).

نصری و همکاران(۲۰۰۴) در مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره توتال میوه پنج انگشت موجب کاهش FSH, LH و تستوسترون در موش نر نژاد بآلب سی می‌شود. از این رو به نظر می‌رسد این عصاره به دلیل کاهش تستوسترون بر روی اسپرماتوژنز نیز مؤثر بوده و آن را کاهش می‌دهد(۱۱). بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره میوه پنج انگشت بر اسپرماتوژنز موش نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی می‌باشد که طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۶ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان انجام شد. در مجموع تعداد ۵۶ موش نر بالغ

گیاه پنج انگشت^(۱) از خانواده شاه پسند^(۲) به صورت درختچه‌ای با ارتفاع ۱ تا ۲/۵ متر است. برگ‌ها زود افت، پنجه‌ای و منقسم به ۵ تا ۷ برگچه است. سطح تحتانی پهنک پوشیده از کرک‌های پنبه‌ای می‌باشد. گل‌های آن به رنگ آبی مایل به بنفش و مجتمع به صورت سنبله دراز با ظاهر مطبق، بر روی یک پایه مشترک است. میوه آن شفت و دارای درون بر سخت و مقاوم است. از کلیه قسمت‌های این گیاه مخصوصاً برگ و میوه آن بوی فلفل استنشام می‌شود، بنابراین به فلفل نیز موسوم است(۲ و ۱). گیاه پنج انگشت بومی نواحی مرکزی آسیا بوده که امروزه انتشار فراوانی در نقاط جنوبی و گرم اروپا، منطقه مدیترانه، مناطق گرم ایالات متحده و نواحی دیگر دارد(۳). در ایران این گیاه در تهران، کرج، خراسان، خرمشهر، خلیج فارس و قم می‌روید. در کتب قدیمی ایران از گیاهی به نام پنجنگشت اسم برده شده که از جمله مصارف آن را مداوای درد و ورم رحم می‌دانسته‌اند و ذکر شده که بخور دادن و پاشیدن آن در بستر میل جنسی را کم می‌کند. میوه آن جهت رفع سر درد، نفخ، تب و بیبوست مصرف می‌شد(۴). در طب سنتی اروپا، از این گیاه برای درمان مشکلات قاعدگی ناشی از کمبود جسم زرد، شامل سندرم قبل از قاعدگی، قاعدگی دردناک و اسپاسمی، جهت رفع عوارض یائسگی و افزایش شیر مادران استفاده می‌شد(۵). این گیاه ترکیبات دوپامینرژیک دارد که به رسپتورهای دوپامین در بخش پیشین هیپوفیز متصل

1-Vitex Agnus Castus L
2-Verbenaceae

به ۳ گروه، کنترل، شم، تجربی (۶۵، ۱۶۵، ۲۶۵، ۳۶۵ و ۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره دانه گیاه) تقسیم شدند.

در این تحقیق از میوه گیاه پنج انگشت (جمع‌آوری شده از منطقه قم) که در هرباریوم بخش فارماکوتکوزی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران مورد تأیید قرار گرفت استفاده شد. پس از آسیاب کردن میوه‌ها، مقدار ۱۰۰ گرم از پودر خشک گیاه وزن کرده و جهت تهیه عصاره با روش پرکولاسیون به کار رفت. به این منظور از نسبت ۸۰ به ۲۰ الکل اتانول به آب مقطر استفاده شد. سپس محلول به دست آمده را از صافی عبور داده و به دور از نور مستقیم، خشک کرده و جهت تزریق، عصاره در نسبت ۱ به ۲۰ دی متیل سولفوکساید^(۱) در نرمال سالین حل شد (۱۲ و ۱۳).

در این مطالعه از موش‌های کوچک نر نژاد بآلب سی با وزن ۲۵-۳۰ گرم که از مؤسسه پاستور خریداری شده بود استفاده شد.

پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید و در کمیته اخلاق این دانشگاه به تصویب رسید.

موش‌ها در قفس‌های ده تایی با دوره شبانه روزی طبیعی و در دمای ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، با آب و غذای کافی نگهداری شدند. در هر سری آزمایش ۸ سر موش مورد بررسی قرار گرفت. موشهای نر بالغ به ۳ گروه تقسیم شدند و تزریقات به صورت داخل صفاقی انجام شد؛ گروه کنترل؛

موش‌های نر بالغ که هیچ تزریقی در آنها انجام نشد، گروه شم؛ موش‌های نر بالغ که نسبت ۱/۲۰ دی متیل سولفوکساید به نرمال سالین را دریافت می‌کردند و گروه‌های تجربی شامل؛ موش‌های نر بالغ که دوزهای ۶۵، ۱۶۵، ۲۶۵، ۳۶۵ و ۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره را که به نسبت ۱/۲۰ با دی متیل سولفوکساید به عنوان حلال حل شده بود را دریافت می‌کردند. انتخاب دوزها با توجه به دوز کشنده عصاره^(۲) که ۱/۶۵ گرم بر کیلوگرم وزن حیوان محاسبه شده، انجام شد (۱۱). میزان دوز مؤثر ۱/۱۰ این دوز یعنی ۱۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نظر گرفته شد و علاوه بر آن دوزهای ۶۵، ۲۶۵، ۳۶۵ و ۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان نیز تزریق شد (۱۴). تزریقات روزی یکبار و به مدت ۱۰ روز تکرار شد.

دو هفته پس از آخرین تزریق، موش‌ها به وسیله قطع نخاع کشته شده و بیضه و اپیدیدیم چپ آنها از بدن خارج شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژی و جداسازی بافت چربی، به کمک کولیس قطر بیضه‌ها (قطر کوچک و قطر بزرگ) و با ترازوی دقیق وزن آنها اندازه‌گیری شد.

برای محاسبه حجم بیضه‌ها از فرمول $V = (d^2 \times \pi / 4) L \times K$ استفاده شد که در این فرمول V حجم بیضه، d قطر کوچک بیضه، L قطر بزرگ بیضه، $\pi = 3/14$ و $K = 7/9$ ، (ضریب ثابت) می‌باشند (۱۵).

1-DMSO
2-Lethal Dose 50 (LD50)

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS^(۳) و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه^(۴) و توکی^(۵) تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

مقایسه وزن حیوانات در گروه کنترل با گروه شم و تجربی قبل و پس از ۱۰ روز تزریق درون صفاقی عصاره تام گیاه پنج انگشت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). نتایج به دست آمده از بررسی وزن و حجم بیضه‌ها تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های کنترل، شم و تجربی را نشان نمی‌دهد. همچنین اندازه‌گیری قطر بزرگ و کوچک بیضه‌ها تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های کنترل، شم و تجربی را نشان نداد (جدول ۲).

پس از مطالعه برش‌های بافتی در گروه‌های تجربی، تغییراتی در مقایسه با کنترل و شم مشاهده شد. در گروه‌های تجربی درجاتی از بی‌نظمی در لوله‌های سمینفر مشاهده شد، به طوری که تعدادی از سلول‌های زاینده در وسط لوله دیده می‌شدند در حالی که اسپرماتوزوئیدها در اطراف آنها قرار گرفته بودند. از جمله تغییرات دیگر مرگ سلولی به صورت هسته‌های پیکنوتیک، حفره‌دار شدن لوله‌ها، خالی شدن لوله‌های منی‌ساز و افزایش فاصله بین سلول‌ها، حضور بقایای سیتوپلاسمی در اطراف لومن و

پس از مشاهدات ماکروسکوپی، بیضه‌ها و اپیدیدیم حیوانات به فیکساتیو بوئن منتقل شدند. سپس مراحل تثبیت و آب‌گیری انجام شده و از نمونه‌ها برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شده و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین انجام شد. به منظور بررسی تغییرات بافتی ایجاد شده، ۵ لام رنگ‌آمیزی شده به طور تصادفی انتخاب گردید و از هر یک ۵ مقطع عرضی به کمک نرم افزار موتیک^(۱) اندازه‌گیری شد. بررسی‌های انجام شده عبارتند از: اندازه‌گیری قطر کوچک و بزرگ لوله‌های منی‌ساز، اندازه‌گیری ضخامت اپیتلیوم ژرمینال لوله‌های منی‌ساز، اندازه‌گیری ضخامت سلول‌های پوششی اپیدیدیم، اندازه‌گیری قطر کوچک و بزرگ اپیدیدیم.

جهت شمارش اسپرمی، در همه گروه‌ها، قسمت دمی اپیدیدیم راست جدا شده و به وسیله قیچی به قطعات کوچک ریز شد. آنگاه به مدت ۲۰ دقیقه در ۱ میلی‌لیتر محلول هانکس^(۲) در انکوباتور قرار داده شد. پس از خروج اسپرم‌ها، از سوسپانسیون اسپرم رقت ۱/۱۰۰ تهیه شد و به منظور شمارش تعداد اسپرم‌ها از لام نئوبار استفاده شد. سپس به وسیله سمپلر ۲۰ میکرولیتری، یک قطره از محلول هانکس را روی لام قرار داده و با استفاده از مربع‌های مربوط به شمارش گلبول سفید (۱۶ خانه‌ای) به طور دقیق شمارش و تعداد اسپرم‌ها محاسبه شد و میانگین اعداد حاصل از شمارش خانه‌ها محاسبه شد.

1-Motic 2000
2-Hanks Blanced Salt Solution (HBSS)
3-Statistical Package for Social Sciences
4-Analysis of Varians(ANOVA)
5-Tukey

معنی داری مشاهده نشد. همچنین نتایج نشانگر افزایش معنی دار مساحت بافت بینابینی در گروههای ۲۶۵ و ۳۶۵، میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به کنترل و شم بود ($p < 0/001$) (جدول ۳).

اندازه گیری ها در اپیدیدیم حاکی از افزایش ضخامت اپیتلیوم اپیدیدیم بود، اما این تغییرات بسیار اندک بوده و نسبت به کنترل معنی دار نیست. همچنین قطر کوچک و بزرگ اپیدیدیم تغییرات معنی داری نشان نداد (جدول ۴). تعداد اسپرم ها در دوز ۲۶۵ و ۳۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره در مقایسه با کنترل و شم کاهش معنی داری نشان داد ($p < 0/01$) (جدول ۴).

افزایش بافت بینابینی بود که در تمامی گروههای تجربی مشاهده شد. در بررسی برش های بافتی اپیدیدیم، کاهش تعداد اسپرماتوزوئیدهای موجود در لومن و بعضاً خالی شدن کامل لوله ها و شکل غیرطبیعی آنها مشاهده شد (تصویر ۱).

نتایج تغییر معنی داری در قطر کوچک و بزرگ لوله های سمینفر در گروههای تجربی نسبت به کنترل و شم نشان نداد (جدول ۳). ضخامت اپی تلیوم ژرمینال لوله های سمینفر کاهش معنی داری در گروههای ۲۶۵ و ۳۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به کنترل نشان داد ($p < 0/05$)، اما نسبت به شم اختلاف

جدول ۱: تغییرات وزن حیوانات در گروههای کنترل، شم و تجربی (تعداد = ۸)

گروهها	وزن حیوان بر حسب گرم	اولیه	نهایی
		انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین
کنترل		۲۶/۴۲±۱/۲	۳۰/۱±۰/۵۸
شم		۲۶/۶±۰/۸۲	۲۹±۱/۵
تجربی			
۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۲۹±۱/۴	۲۸/۲±۱/۴
۱۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۲۶±۱/۲	۳۱/۷±۲/۲
۲۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۲۵±۱/۱	۳۰/۱±۱/۹
۳۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۲۶/۱±۱/۴	۲۸/۷±۰/۵۲
۴۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۲۵/۲±۱	۳۰/۶±۱/۳

جدول ۲: تغییرات وزن، حجم، قطر کوچک و بزرگ بیضه در گروههای کنترل، شم و تجربی (تعداد = ۸)

گروهها	مشاهدات ماکروسکوپی	وزن (میلی گرم)	حجم (میلی لیتر)	قطر کوچک (میلی متر)	قطر بزرگ (میلی متر)
		انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین
کنترل		۹۹/۳±۴/۶	۰/۰۷۶±۰/۰۰۷	۴/۲۳±۰/۱۵	۵/۹۴±۰/۲۴
شم		۱۰۵/۴±۶/۸	۰/۰۹۵±۰/۰۰۷	۴/۶±۰/۰۹	۶/۳±۰/۳۶
تجربی					
۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۱۱۲/۹±۷/۷	۰/۰۸۸±۰/۰۰۶	۴/۴۳±۰/۰۹	۶/۲۸±۰/۳
۱۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۱۱۸/۶±۷/۸	۰/۱۰۲±۰/۰۰۳	۴/۶۷±۰/۰۷	۶/۵۹±۰/۰۷
۲۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۱۰۲/۳±۴/۹	۰/۰۸۷±۰/۰۰۱	۴/۳۴±۰/۰۷	۶/۳۶±۰/۱۸
۳۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۱۰۲/۴±۵/۱	۰/۰۹۳±۰/۰۰۵	۴/۶۱±۰/۰۹	۶/۱۳±۰/۲
۴۶۵ میلی گرم بر کیلوگرم		۱۱۹/۹±۱۱/۴	۰/۱۰۲±۰/۰۱۶	۴/۶±۰/۲۶	۶/۶۵±۰/۴

جدول ۳: قطر کوچک، بزرگ و ضخامت اپی تلیوم ژرمینال لوله‌های سمینفر و مساحت بافت بینابینی در گروه‌های کنترل، شم و تجربی (تعداد= ۸)

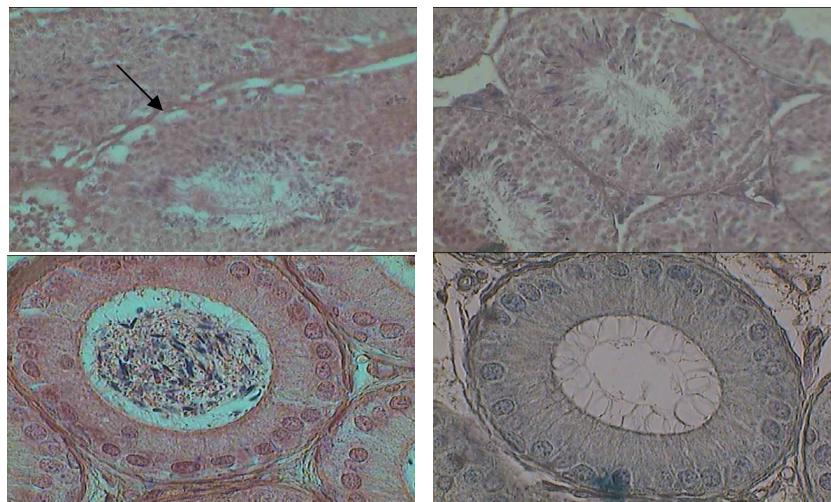
مشاهدات میکروسکوپی	قطر کوچک (میکرومتر)	قطر بزرگ (میکرومتر)	ضخامت اپیتلیوم ژرمینال (میکرومتر)	مساحت بافت بینابینی (میکرومتر)	سطح	معنی‌داری
گروه‌ها	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	سطح	معنی‌داری
کنترل	۱۹۰/۶۸±۱۰/۸	۲۵۷/۳±۱۸/۹	۷۵/۶۸±۳/۴	۲۰۳۷/۵±۲۰/۸	NS	
شم	۲۱۲/۳±۶/۳	۲۴۲/۱±۱۴/۹۵	۶۷/۳۳±۴/۶	۲۰۷۱/۸۳±۲۶/۲	NS*	
تجربی						
۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۸۵/۰۸±۴/۶	۲۳۸/۲±۱۷/۵۷	۶۴/۰۳±۲/۶	۲۶۰۱/۷±۲۳/۶	NS*	
۱۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۸۵/۰۵±۱۰/۲	۲۴۰/۴±۱۳/۴	۶۱/۲±۳/۳	۲۸۱۳/۸±۳۹/۲	NS*	
۲۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۸۹/۰۵±۱۳/۶	۲۳۰/۱±۱۵/۱۸	۵۵/۹±۷/۱*	۳۲۴۰/۸۳±۵۰/۹*	۰/۰۰۱	
۳۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۰۱/۲±۱۰/۷	۲۴۳/۷±۸/۴۳	۵۷/۵±۳/۶*	۳۱۰۸/۸±۶۰/۲*	۰/۰۰۱	
۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۱۷۵/۸±۸/۹۶	۲۰۶/۳±۱۲/۶۹	۵۹/۹±۳/۳	۳۱۱۳/۵۷±۴۸/۳*	۰/۰۰۱	

*NS: Not Significant

جدول ۴- ضخامت بافت پوششی، قطر کوچک و بزرگ اپیدیدیم و تعداد اسپرم در هر میلی لیتر محلول هانکس در گروه‌های کنترل، شم و تجربی (تعداد= ۸)

مشاهدات میکروسکوپی	ضخامت بافت پوششی (میکرومتر)	قطر کوچک اپیدیدیم (میکرومتر)	قطر بزرگ اپیدیدیم (میکرومتر)	تعداد اسپرم × ۱۰ ^۶	سطح	معنی‌داری
گروه‌ها	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	سطح	معنی‌داری
کنترل	۲۱/۸±۱/۶	۱۱۷/۹۸±۱۱/۴	۱۴۷/۹±۱۴/۶	۴/۴۱±۰/۰۹	NS	
شم	۲۴/۱±۱/۳	۱۰۷/۷۶±۳/۴	۱۵۵/۱۹±۱۱/۱	۴/۲۲±۰/۰۷	NS*	
تجربی						
۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۶/۶±۱/۵	۱۱۵/۵۵±۶/۹	۱۴۶/۴۷±۱۲/۵	۴/۱۷±۰/۱۶	NS*	
۱۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۶/۸±۱/۴	۱۰۴/۱۸±۳/۷	۱۴۵/۱۲±۹/۶	۳/۸۵±۰/۰۱۷	NS*	
۲۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۴/۷±۱/۸	۹۶/۶۵±۴/۸	۱۳۲/۱۶±۱۲/۱	۳/۶۵±۰/۰۱۲	۰/۰۰۱	
۳۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۵/۹±۱/۵	۱۱۵/۳±۳/۲	۱۵۸/۹±۵/۹	۳/۵۸±۰/۰۱۲	۰/۰۰۱	
۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۲۶/۲±۱/۶	۱۰۵/۶±۵/۴	۱۵۰/۱۲±۷/۸	۳/۹۷±۰/۰۰۶	NS*	

*NS: Not Significant



تصویر ۱: فتومیکروگراف مقطع عرضی لوله‌های سمینفر و اپیدیدیم با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین

بالا راست: لوله‌های سمینفر طبیعی، بالا چپ: پیکان حفره‌دار شدن لوله‌های سمینفر را در گروه‌های تجربی نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۴۰۰X).

پایین چپ: کاهش تعداد اسپرم در لوله اپیدیدیم در گروه‌های تجربی، پایین راست: لوله اپیدیدیم تهی از اسپرم در گروه‌های تجربی (بزرگنمایی ۱۰۰۰X).

بحث و نتیجه گیری

از آنجا که پژوهش‌های قبلی نشان داد که عصاره گیاه پنج انگشت موجب کاهش تستوسترون می‌شود (۱۱)، به نظر می‌رسید عصاره این گیاه اثرات ضد باروری داشته باشد، لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر عصاره گیاه بر اسپرماتوژنز موش سوری مورد پژوهش قرار گرفت.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره میوه گیاه پنج انگشت بر روی وزن حیوانات پس از ۱۰ روز تزریق متوالی اثری نداشت که نشانگر عدم سمی بودن آن در دوزهای مورد استفاده است. عصاره گیاه پنج انگشت یک اثر ضد باروری ملایم دارد، به طوری که این عصاره بر مورفولوژی بیضه (وزن، حجم، قطر لوله‌های سمینفر و اپیدیدیم) تأثیری نداشت، اما باعث کاهش ضخامت اپیتلیوم زاینده لوله‌های سمینفر شد و در واقع تعداد سلول‌های اسپرماتوژنیک کاهش یافت. اسپرماتوژنز، یک فرآیند پیچیده است و تجزیه اسپرماتوگونی بخش ضروری اسپرماتوژنز طبیعی می‌باشد اما همواره تعدادی از اسپرماتوگونی‌ها به عنوان جمعیت پشتیبان باقی می‌مانند (۱۶). در موش سوری، بالغ بر ۷۵ درصد سلول‌ها در مرحله اسپرماتوگونی از بین می‌روند (۱۷). تجزیه اسپرماتوگونی می‌تواند در اثر مواد شیمیایی سمی، گرما، پرتوها، نقص ایمنی و اختلالاتی در هورمون‌ها و فاکتورهای رشد رخ دهد (۱۸). بر اساس مطالعات قبلی به نظر می‌آید که عصاره میوه پنج انگشت می‌تواند ترشح LH, FSH و تستوسترون را

در دوزهای ۱۶۵، ۲۶۵ و ۳۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش دهد. پنج انگشت اثر آنتی آندروژنیک دارد و می‌تواند از طریق مسیر دوپامینرژیک اثرات خود را اعمال کند و بر محورهای گنادوتروپین - سرتولی و محور گنادوتروپین - لایدیگ مؤثر است (۱۱). بنابراین کاهش تستوسترون ممکن است به علت کاهش هورمون LH باشد که در نتیجه منجر به کاهش اسپرماتوژنز شده است.

اندازه‌گیری مساحت بافت بینابینی نشانگر افزایش مساحت آن در دوزهای ۲۶۵، ۳۶۵ و ۴۶۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بود که ممکن است به علت افزایش سلول‌های لایدیگ و یا التهاب و افزایش سلول‌های التهابی و مایع بینابینی باشد که برای تشخیص دقیق آن مطالعات فلوسایتومتری پیشنهاد می‌شود (۱۱).

از جمله ترکیبات این گیاه می‌توان به مقادیر بالای فلاونوئیدها و اسیدهای چرب ضروری مانند: اسید اولئیک، اسید لینولنیک، اسید پالمیتیک و اسید استئاریک اشاره کرد (۲۰ و ۱۹). در مطالعه‌ای که بر روی دانه‌های گونه دیگری از جنس ویتکس به نام ویتکس نگوندو^(۱)، عصاره غنی از فلاونوئید این گیاه بر روی سیستم تولید مثلی سگ‌های بالغ اخته و سالم مورد بررسی قرار گرفته است. عصاره این گیاه روزانه به تنهایی و یا همراه با تستوسترون پروپیونات به مدت ۳۰ روز در سگ‌های اخته و ۶۰ روز در سگ‌های سالم تجویز شده است. درمان با

1-Vitex negundo

عصاره این گیاه سبب اختلال در مراحل انتهایی اسپرماتوزن می‌شود. اپیدیدیم تهی از اسپرماتوزوئید شده و میزان پروتئین سیالیک اسید و محتوی RNA بیضه‌ها و اپیدیدیم کاهش می‌یابد. کاهش سیالیک اسید، پایین آمدن آندروژن‌ها را منعکس می‌کند (۲۱). در این مطالعه نیز به نظر می‌آید کمبود تستوسترون (از آندروژن‌ها) موجب اختلال در اسپرماتوزن و کاهش اسپرماتوزوئیدهای اپیدیدیم شده است.

در مطالعه‌ای اثر عصاره غنی از فلاونوئید که از دانه‌های ویتکس نگوندو تهیه شده بود بر روی سیستم تولید مثلی موش‌های سوری نر بررسی شد. دوز بالاتر از ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره پس از ۱۵ روز ضعف عملکرد اندام‌های ضمیمه جنسی را نشان داد (۱۸). همچنین بررسی میکروسکوپی اسپرم اپیدیدیمی کاهش تعداد اسپرم و حرکت آن را منعکس کرد که مشابه نتایج مطالعه حاضر در مورد کاهش تعداد اسپرم‌های اپیدیدیمی است. تست سمیت نشان داد که عصاره گیاه بدون ایجاد سمیت شدید در سایر اندام‌های حیاتی باعث اختلال در عمل دستگاه تناسلی نر می‌شود (۲۲).

اسیدهای چرب غیر استری مانند؛ اسید لینولئیک، اسید اولئیک، اسید استئاریک و اسید پالمیتیک مهارکننده ترشح تستوسترون از سلول‌های لایدیگ در پاسخ به LH هستند که عمل مهاری آنها وابسته به کلسیم خارج سلولی است، زیرا آگونیست‌های کانال‌های کلسیم افزایش دهنده شدت مهارکنندگی آنها است. اسیدهای چرب غیر استری با

ایجاد وقفه در یکی از مراحل تبدیل کلسترول به پروگنولون، مهارکننده استروئیدوزن هستند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که رژیم غذایی محتوی مقدار فراوان اسیدهای چرب اشباع نشده کاهش دهنده تعداد رسپتورهای LH موجود در سطح سلول‌های لیدیگ است که متعاقب آن میزان ترشح تستوسترون کاهش می‌یابد (۲۳ و ۲۴). بنابراین این محتمل است که اسید لینولئیک، اسید اولئیک، اسید استئاریک و اسید پالمیتیک موجود در عصاره پنج انگشت با کاهش تعداد رسپتورهای LH و یا با ایجاد اختلال در مراحل تشکیل تستوسترون مهارکننده باروری باشد.

مطالعه حاضر اولین مطالعه انجام شده در مورد اثر عصاره گیاه پنج انگشت بر باروری جنس نر است. نتایج این مطالعه حاکی از آن است که عصاره این گیاه آسیب‌هایی در بافت بیضه و همچنین اپیدیدیم ایجاد می‌کند که استفاده مداوم آن می‌تواند منجر به ناباروری گردد. پیشنهاد می‌شود جهت پی بردن به مکانیسم دقیق چگونگی ایجاد ناباروری به وسیله این عصاره تجزیه کمی و کیفی عصاره و شناخت ماده مؤثر صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح پژوهشی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد آشتیان با شماره ۱۵۷۰ است. نویسندگان از دکتر غلامرضا امین برای تهیه عصاره گیاه پنج انگشت و نظرات ارزشمندشان در مورد فارماکولوژی گیاه کمال تشکر را دارند.

The Effects of Vitex Agnus Castus L Total Extract on Spermatogenesis of Balb/C Mice

Ramezani M^{*},
Nasri S^{**},
Bahadoran H^{***}

^{*} Assistant Professor of Biology,
Department of Biology, Faculty of
Science, Islamic Azad University,
Ashtian Branch, Iran

^{**} Assistant Professor of Biology,
Department of Biology, Faculty of
Science, Payame noor University of
Tehran, Iran

^{***} Assistant Professor of Anatomy,
Department of Anatomy, Faculty of
Medical, Baghiat Allah University,
Tehran, Iran

KEYWORDS:

**Vitex agnus castus,
Male Gonad,
Spermatogenesis,**

Received: 11/12/2008

Accepted: 09/03/2009

Corresponding Author: Ramezani M
Email: Mina.ramezani@gmail.com

ABSTRACT

Introduction & Objective: Vitex agnus castus (Verbenaceae) is a phytoestrogenic herb native to the Middle East and southern Europe. It has clinical usage in so many countries. In this research, the effects of Vitex agnus castus extract was investigated on spermatogenesis of male Balb/C mice.

Materials & Methods: This is an experimental study in which adult male mice were chosen and divided into 3 groups: control, vehicle, and experimental. Animals were daily injected (i.p.) with 65, 165, 265, 365, and 465 mg/kg of seed extract for ten consecutive days. Then the animals were weighed and eventually killed by cervical dislocation 2 weeks after the last injection. The caudal part of the right epididymis was used for sperm counting. After macroscopic investigation (weight, diameter and volume of testes) tissues were fixed in Buin's fixative. Tissues were cut at 5 µm, stained with Hematoxylin and Eosin (H& E). Collected data was analyzed by the SPSS software by using one-way ANOVA.

Results: No significant differences in body weight, volume, weight and diameter of testes was seen. Light microscopic studies showed a significant reduction in germinal epithelium in doses of 265 and 365 mg/kg and increased of interstitial tissue area in doses of 265, 365, and 465 mg/kg of extract. There was no significant difference in epithelium thickness and of the diameter of the epididymis. Germinal cells contained pyknotic nuclei and several holes that were found scattered in the tubules. Testis also showed a general disarrangement in various germinal elements of seminiferous tubules. Result of sperms count indicated a significant decreasing of spermatozoa in animals which received 265 and 365 mg/kg of extract.

Conclusion: Vitex agnus castus contains essential oils, iridoid glycosides, flavonoids diterpenes, and essential fatty acids. The results suggest that its contraceptive effects is related to its flavonoids and essential fatty acids but further studies is needed to focus on the pharmacokinetics of this plant.

REFERENCES:

1. Akhondzadeh SH, Iran's encyclopedia of medicinal plants. 1st ed. Iran: Arjomand press; 2000; 1: 51.
2. Daniele C, Thompson Coon J, Pittler MH, Ernst E. *Vitex agnus-castus*: a systematic review of adverse events. *Drug Saf* 2005; 28(4): 319-32.
3. Jonia MS, Stavros THK. Parameters influencing the yield and composition of the essential oil from cretan *Vitex agnus-castus* fruits. *Planta Medical* 1999; 66: 245-50.
4. Ansarishirazi A. *Ekhtiarat Badiee*. 1st ed. Iran: The drug distributing company of Razi; 1996; 70-73.
5. Newall C, Anderson L, Phillipson J. *Herbal medicine*. The pharmaceutical press 1996; 19-20.
6. Wuttke W. Dopaminergic action of extracts of *Agnus Castus*. *Forschende Komplementarmedizen* 1996; 3: 329-30.
7. Roemheld-Hamm B. Chasteberry. *Am Fam Physician* 2005; 72(5): 821-824.
8. Azarnia M, Ejtemaei-Mehr S, Shakoor A, Ansari A. Effects of *Vitex agnus castus* on mice fetus development. *Acta Medica Iranica* 2007; 45(4): 263-70.
9. Ohyama K. Cytotoxicity and apoptotic inducibility of *Vitex agnus-castus* fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 10-8.
10. Ozturk A, Ilman AA, Saglam H, Yalcinkaya U, Aykut S, Akgoz S, et al. The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery* 2008; 14(1): 21-7.
11. Nasri S, Oryan SH, Rohani AH, Amin GHR, Yahyavi H. The effects of *Vitex agnus castus* L. extract on Gonadotrophines and Testosterone in male mice. *Iranian International Journal of Science* 2004; 5(1): 25-31.
12. Zakaria ZA, Gopalan HK, Zainal H, Mohd NH, Mrsiu NA. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* chloroform extract in animal models. *Yakugaku- Zasshi* 2004; 126(11): 1171-8.
13. Ramezani M, Nasri S, Yassa N. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of isolated fraction from *Apium graveolens* seeds in mice. *Pharmaceutical Biology* 2009; 5.
14. Hodgson E, Levi EP. *A text book of modern toxicology, Measurement of toxicity*. 3rd ed. USA: Elsevier; 1987; 233-287.
15. Courtade M. Clinical characteristic and transmission electron microscopic sperm defect of infertile men. *Fert Steril* 1998; 70: 297-304.
16. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Kenobil E, Neill JD editors. *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994; 1363-434.
17. Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. *Am J Androl* 1962; 2: 37-58.
18. Yang HS, Han DK, Kim JR, Sim JC. Effects of α -tocopherol on cadmium-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. *J Korean Med Sci* 2006; 21: 445-51.
19. Dugoua JJ, Seely D, Perri D, Koren G, Mills E. Safety and efficacy of chastetree (*Vitex agnus-castus*) during pregnancy and lactation. *Can J pharmacol* 2008; 15(1): 74-9.
20. Du Mee C. *Vitex agnus-castus*. *Aust J Med Herbalism* 1993; 5: 63-5.
21. Bhargava SK. Antiandrogenic effects of a flavonoid-rich fraction of *Vitex negundo* seeds: a histological and biochemical study in dogs. *J Ethnopharmacol* 1989; 27(3): 327-39.
22. Das S, Parveen S, Kundra CP, Pereira BM. Reproduction in male rats is vulnerable to treatment with the flavonoid-rich seed extracts of *Vitex negundo*. *Phytother Res* 2004; 18(1):8-13.
23. Meikle A, Benson S, Boam W, Liu X, Stringham J. Nonsterified fatty acids modulate steroidogenesis in mouse leydig cells. *Am J Physiol* 1989; 257: 37-42.
24. Siegel I, Dudkiewicz A, Friberg J, Suarez M, Gleicher N. Inhibition of sperm cells by free fatty acids in whole semen. *Fertil Steril* 1986; 45: 273-9.