مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره اول، شماره دوم، بهار 1390

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثر عصاره الکلی گیاه شاهتره بر اسپرماتوژنز در موش صحرایی نر

مریم ناصری[1]، میترا حیدری نصرآبادی*[2]، پروین خدارحمی[2]، فریبا سادات احمدی[1]، پریسا مجیبی[1]، هلیا ابوطالبی[3]

[1]کارشناس زیست شناسی عمومی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران.
[2]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران.
[3]کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اسپرماتوژنز روندی است که در طی آن سلول های جنسی نر تولید می شوند و اختلال در هر یک از مراحل آن، می تواند به نا باروری بیانجامد. شاهتره گیاهی است دارای آلکالوئیدهای پروتوپین و ایزوکوئینولین و دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد. یکی از موارد استفاده این گیاه در طب سنتی تقویت قوای جنسی می باشد. هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر عصاره ی الکلی گیاه شاهتره بر روند اسپرماتوژنز می باشد.

مواد و روش ها: موش های صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن تقریبی 5±230 گرم به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم بندی شدند. گروه کنترل آب مقطر و گروه تجربی روزانه غلظت 250 mg/ kg.b.w عصاره ی الکلی گیاه شاهتره به مدت 5 روز به طریقه گاواژ دریافت کردند. 15 روز پس از اولین گاواژ موش ها بیهوش شده، به روش باز کردن قفسه سینه کشته شدند و بیضه ها از شکم خارج شد. پس از اندازه گیری های مورفومتری شامل ابعاد و وزن، از بیضه ها برش عرضی تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی گردیدند و سلول های لایه ژرمینال شمارش شدند. کلیه داده ها به روش آماری One Way Anova توسط نرم افزار Spss 16 مورد بررسی قرار گرفتند. سطح معنی دار ی P<0/05 در نظر گرفته شد.

یافت ه ها: نتایج این تحقیق تفاوت معنی داری در ابعاد و وزن بیضه ها نشان نداد در حالی که تعداد سلول های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتوزوئید و لایدیگ، افزایش معنی داری در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل داشت (P<0/01).

نتیجه گیری: عصاره ی الکلی گیاه شاهتره باعث افزایش معنی دار در انواع سلول های دودمان اسپرم در موش های صحرایی نر می شود و در نتیجه افزایش میزان باروری را سبب می گردد.

کلمات کلیدی: گیاه شاهتره، عصاره الکلی، اسپرماتوژنز، باروری

مقدمه

تیره شاهتره عموماً گیاهانی علفی، بی کرک و دارای برگ های متناوب با بریدگی های بسیار هستند که بیشتر در نواحی مختلف کوهستانی و یا در اماکن مرطوب پراکندگی دارند و شامل 5 جنس و 70 گونه هستند (امین ،1370 ;Zargari, 1998). گیاه شاهتره ریشه دراز سفید رنگ و ساقه کوچک دارد. قسمت های مورد استفاده گیاه، کلیه اندام های آن مخصوصاً سر شاخه های گلدار است که به صورت تازه یا خشک مصرف می شود (زرگری، 1376). اعضای مختلف این گیاه دارای موادی نظیر: مواد رزینی، املاح معدنی مختلف، موسیلاژ، اسید فوماریک و آلکالوئیدی به نام فومارین (پروتوپین) می باشد (Saua et al,. 2002).

قسمت هوایی گیاه حاوی حدود یک در صد آلکالوئید است بیش از 30 عدد آن ها تعیین فرمول شده اند. اکثر این آلکالوئیدها از مشتقات بنزیل ایزوکوئیولین هستند (Hentschele, 1995; Deng, 2001; Ko, 1992). مهم ترین این آلکالوئیدها شامل فومارین (پروتوپین)، فوماریلین و سیناکتین می باشند (قهرمان ،1373). از دیگر ترکیبات شاهتره می توان به فلاوونوئیدها، اسیدهای گیاهی به ویژه اسید فوماریک و موسیلاژ اشاره کرد (Suan, 2003).

در طب سنتی از شاهتره به عنوان ادرار آور، مسهل و جهت رفع مشکلات پوستی از جمله اگزما استفاده می شود. اثر اخیر را مربوط به وجود اسید فوماریک در آن می دانند. اثرات گزارش شده ی آن: آنتی کلی نرژیک، آنتی هیستامین، ضد ورم، ضد عفونی کننده، ضد اسپاسم، تقویت کننده ی قوای جنسی، آرام بخش، مقوی عده، بی حس کننده و کاهش دهنده ی صفر می باشد (Zargari, 1990). مصرف مقدار عادی و دارویی شاه تره دارای عوارض جانبی نیست.

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران
Email: Heydari_nasi@yahoo.com
تاریخ دریافت: 89/8/17
تاریخ پذیرش:89/11/16

ولی مصرف مقادیر بسیار زیاد به دلیل وجود آلکالوئیدهای ذکر شده ممکن است باعث لرز، تشنج و مرگ گردد. فعالیت آنتی اکسیدانی و محافظت از مسمومیت کبدی عصاره متانولی *F. parviflora* در دوز 500 mg/kg به اثبات رسیده است (Haq, 1993). عصاره ی آبی اتانولیک *parviflora* باعث طولانی تر شدن خواب به دلیل وجود پنتوباربیتول و نیز افزایش مرگ و میر به دلیل وجود استریکینین در موش ها شده است (Shafizadeh, 2002). فعالیت آنتی کولین استراز بخش هوایی این گیاه نیز ثابت شده است (Hentschele, 1995). مطالعات فارماکولوژیکی در سال 1984 و 2004 نشان داده که *F. parviflora* دارای فعالیت های ضد التهابی، ضد دیابتی است (Deng, 2001).

اثرات ضد درد *F. parviflora* در موش های صحرایی بررسی و به اثبات رسیده است (Duke, 2002). با توجه به استفاده گیاه شاهتره در طب سنتی به عنوان تقویت کننده قوای جنسی، مطالعه حاضر جهت بررسی اثر عصاره الکلی این گیاه بر روند اسپرماتوژنز طراحی شده است.

مواد و روش ها

تهیه گیاه و عصاره گیری

گیاه شاهتره استفاده شده برای این تحقیق از گردنه ی حیران در اردبیل جمع آوری شد. گیاهان جمع آوری شده در سایه و در دمای 25 درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا خشک و به صورت پودر در آیند. برای عصاره گیری، صد گرم پودر گیاه داخل بشر و روی آن متانول خالص 100 درجه ریخته شد. دهانه ی بشر پوشانده و در بن ماری در دمای 45 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت قرار داده شد. پس از آن، بشر به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت. سپس توسط پمپ خلاء محلول صاف و یکنواخت شد. محلول تهیه شده در بالن ریخته شد و با دستگاه روتاری عمل تقطیر در خلاء با دور 60 درجه و در دمای 64 درجه سانتی گراد انجام گرفت.

حیوانات

14 عدد موش صحرایی نر نژاد ویستار از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط یکسان نوری و رطوبت طبیعی داخل قفس هایی از جنس پلی اتیلن گلیکول که قابل استریل شدن هستند، در حیوان خانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند نگهداری شدند. به منظور تطابق با محیط جدید و رسیدن به وزن مورد نظر همه حیوانات به مدت چند روز با آب و پلت های معمولی تغذیه شدند.

پس از این که موش ها به وزن 5±230 گرم رسیدند، به دو گروه کنترل و تجربی، که هر گروه شامل 7 سر موش بود تقسیم بندی شدند.

موش های گروه کنترل توسط آب مقطر و گروه تجربی توسط عصاره الکلی گیاه شاهتره یک بار در روز برای 5 روز متوالی گاواژ شدند. برای محاسبه میزان عصاره شاهتره برای گاواژ بر حسب وزن بدن موش ها از فرمول زیر استفاده شد:

$$A = \frac{B \times C}{1000}$$

A= مقدار لازم عصاره برای گاواژ موش ها (میلی گرم)

B= وزن موش (گرم)

C= غلظت مورد نظر (mg/kg.b.w)

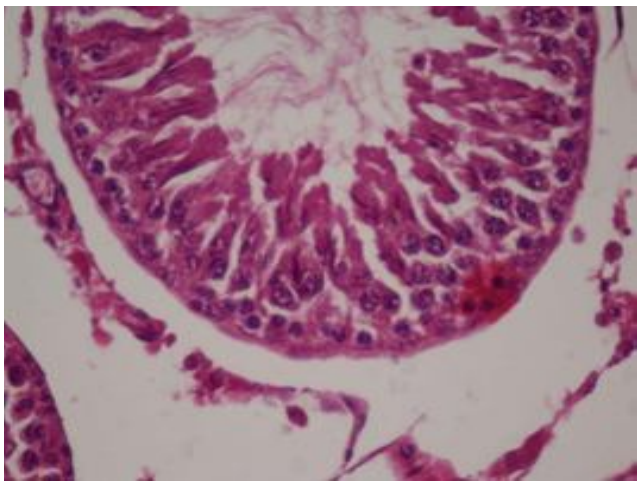
مقدار حاصل از فرمول بالا بر حسب میلی گرم می باشد، که این مقدار از عصاره با یک میلی لیتر روغن مایع رقیق و به موش ها گاواژ شد.

روش نمونه گیری

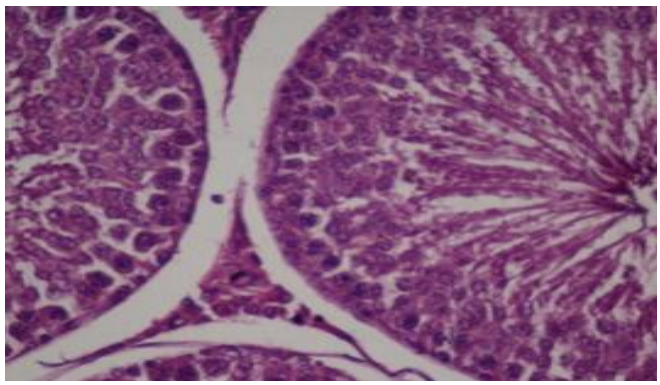
15 روز پس از اولین گاواژ موش ها با کلروفرم بیهوش شده و با باز کردن قفسه سینه کشته شده و بیضه آن ها خارج گردید. بیضه ها توسط سرم فیزیولوژی شستشو داده شدند، قطر بزرگ، کوچک و وزن آن ها محاسبه شد. نمونه ها در داخل فیکساتور بوئن قرار گرفته و پس از 48 ساعت مراحل تهیه بافت انجام و لام ها به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده و برای مطالعه با میکروسکوپ نوری آماده شدند. سپس سلول های دودمان اسپرمی شامل تعداد سلول های ژرمینال، قطر لوله های اسپرم ساز تعداد سلول های لایدیگ و تعداد اسپرماتوسیت ها به کمک یک صفحه مدرج (eye piece) که بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ نوری قرار می گیرد مورد شمارش قرار گرفتند. کلیه آنالیزهای آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری در مورد اطلاعات کمی روش آماری آنوا (ANOVA) استفاده گردید و نتایج آزمایش ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. معیار استنتاج آماری $P<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده از بررسی های مورفومتریک در مطالعه ی حاضر نشان داد که ابعاد بیضه در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش ناچیزی داشته اما این افزایش معنی دار نبوده است. همچنین افزایش عروق به وضوح در گروه تجربی قابل مشاهده بود. بررسی های هیستولوژیک نشان داد که در گروه تجربی تلقیح خوراکی عصاره ی گیاه *F. parviflora parviflora*، با غلظت 250 mg/ kg b.w سلول های لایه ژرمینال را به طور معنی داری افزایش داده است (شکل های ۱،۲).

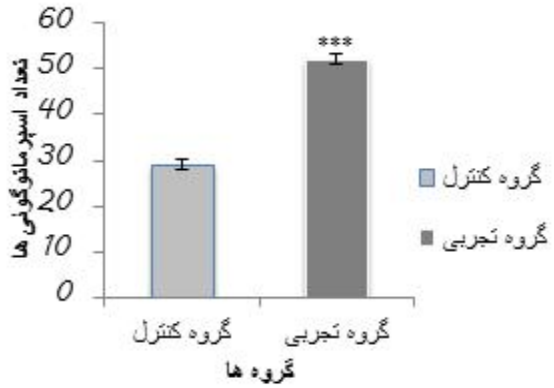


شکل 1- لوله های اسپرم ساز در گروه کنترل.

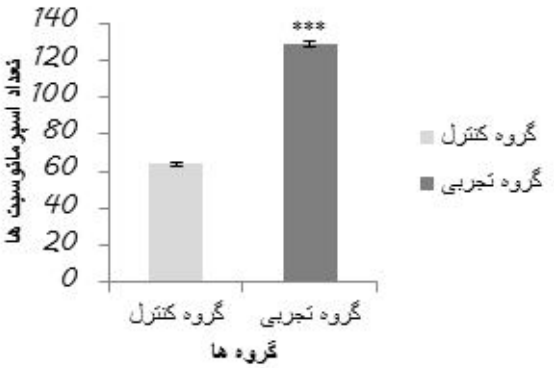


شکل 2- لوله های اسپرم در گروه تجربی.

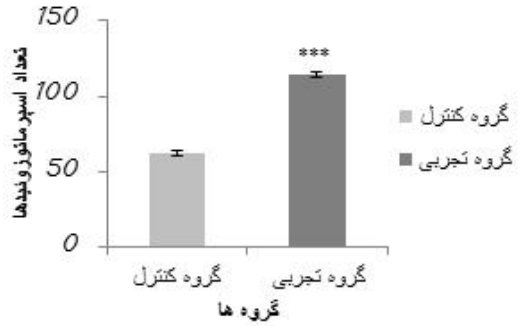
این مشاهدات نشان دادند که تعداد سلول های اسپرماتوگونی در گروه کنترل 29/09±1/23 و گروه تجربی 52/27±1/05 می باشد که گروه تجربی افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل دارد ($P<0.001$) (نمودار 1). اسپرماتوسیت ها در موش های گروه تجربی افزایش معنی دار نسبت به موش های گروه کنترل نشان دادند ($P<0.001$) (نمودار 2) شمارش اسپرماتوزوئیدها حاکی از افزایش معنی دار آن ها در گروه تجربی بود ($P<0.001$) (نمودار 3). همچنین در شمارش سلول های لایدیگ در بافت بیضه موش های صحرایی افزایش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P<0.001$) (نمودار4).



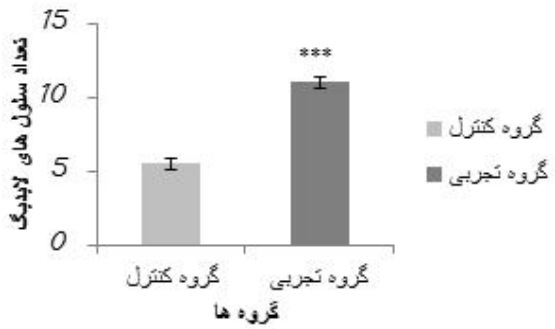
نمودار1- مقایسه سلول های اسپرماتوگونی درگروه های کنترل ،تجربی درگروه تجربی افزایش معنی داری ($P<0/001$) ***نسبت به گروه کنترل دارد.



نمودار2- مقایسه تعداد سلول های اسپروماتوسیت درگروه های کنترل ،تجربی. گروه تجربی افزایش معنی داری ($P<0/001$) ***نسبت به گروه کنترل دارد.



نمودار3- مقایسه تعداد سلول های اسپروماتوزئید درگروه های کنترل ،تجربی. گروه تجربی افزایش معنی داری ($P<0/001$) ***نسبت به گروه کنترل دارد.



نمودار3- مقایسه تعدادسلول های لایدیک درگروه های کنترل ،تجربی. گروه تجربی افزایش معنی داری (P<0/001)***نسبت به گروه کنترل دارد.

بحث

گیاه *F. parviflora* که در ایران اغلب در دامنه های زاگرس بخصوص در دشت اقلید می روید، از دیرباز در طب سنتی مورد توجه بوده است و برای آن ویژگی های درمانی از جمله درمان اگزما و بیماری های پوستی، تحریک عملکرد کبد و مثانه، ضد خارش، ضد سرفه، تب بر، معرق، اشتها آور را متصورند (امین غ ،1370). در دو دهه ی اخیر این گیاه در طب جدید نیز جایگاه ویژه ای یافته است که از جمله خواص بارز اشاره شده این گیاه تقویت قوای جنسی می باشد. بررسی های مورفومتریک این مطالعه نشان داد که ابعاد بیضه در گروه تجربی افزایش ناچیزی داشته، اما این افزایش نسبت به گروه کنترل معنی دار نبوده است، در حالی که افزایش عروق به وضوح در گروه تجربی قابل مشاهده است.

بررسی های هیستولوژیک و شمارش سلول های لایه ژرمینال، شامل اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتوزوئید در داخل لوله های منی ساز نشان داد که در گروه تجربی این سلول ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشته اند (P<0.001). بر اساس مطالعات انجام شده روند اسپرماتوژنز و گذر از سلول های ژرمینال تا رسیدن به مرحله بلوغ سلول های جنسی در گروی مصون ماندن از ضایعات پاتولوژیک و سیتوتوکسیکی است که این پدیده را مورد تهدید قرار می دهد (نیکروش، 1388).

رادیکال های آزاد به دلیل تمایل قوی به گرفتن الکترون، باعث آسیب به دیگر ملکول ها ازجمله اسیدهای چرب غشاهای بیولوژیک و اکسیداسیون آن ها می شوند (مدرسی، 1389). در نتیجه سیالیت، ساختار و عملکرد غشاء به خطر می افتد (Halliwell et al., 1989). ترکیب های آنتی اکسیدان قادرند غشاهای سلولی را در برابر این آسیب ها محافظت کنند (Rice Evans, 1994). پژوهش های انجام شده نشان دهنده وجود ترکیب های آنتی اکسیدانی در شاهتره می باشد (Haq, 1993). به این ترتیب احتمال دارد شاهتره با تقویت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و کاهش استرس های اکسیداتیو باعث افزایش تعداد اسپرم ها شود.

همچنین نتایج این تحقیق نشان دهنده افزایش معنی دار سلول های لایدیگ در گروه تجربی بود. از آنجا که این عصاره علاوه بر سلول های دودمان اسپرم، سلول های لایدیگ را نیز افزایش داده است و این سلول ها به نوبه ی خود، وظیفه ترشح هورمون جنسی نر یعنی تستوسترون را بر عهده دارند که موجب موجب تحریک اسپرماتوژنز می شوند (حسینی، 1389)، می توان نتیجه گیری کرد که یکی از مکانیسم های احتمالی اثر عصاره بر بافت بیضه، افزایش تعداد سلول های لایدیگ و در نتیجه افزایش هورمون جنسی نر و افزایش خون رسانی به بافت بیضه از طریق رگ زایی و تکثیر عروق بوده است. هر دوی این موارد از طریق اثر بر سلول سرتولی، که روند اسپرماتوژنز را تحت کنترل دارد، موجب افزایش سلول های اسپرمی شده اند. این نتایج می تواند تأییدکننده اثر عصاره شاهتره در افزایش اسپرماتوژنز باشد. با توجه به این که، یکی از عوامل منجر به ناباروری در مردان به دلیل الیگوسپرمی یا آزوسپرمی می باشد. بنابراین می توان از این گیاه به عنوان دارویی جهت افزایش باروری در جنس نر و درمان الیگوسپرمی استفاده نمود، هرچند تحقیقات وسیع تری در این زمینه پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند و باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند برای حمایت و تامین اعتبار این طرح پژوهشی و تمام کسانی که ما را یاری رساندند، تقدیر و تشکر می شود.

منابع

1- امین غ. گیاهان دارویی سنتی ایران. معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی.1370جلد اول: 52.

2- حسینی الف، زارع ص، قادری پاکدل ف ، احمدی ع. ارزیابی اثر آنتی اکسیدانی عصاره گیاه جینسینگ و ویتامین E بر باروری موش های بزرگ آزمایشگاهی نر به دنبال تیمار طولانی مدت با سیکلوفسفامید. فصلنامه باروری و ناباروری. 1389دوره 11، شماره 4: 237-227.

3- زرگری غ. گیاهان دارویی. دانشگاه تهران. جلد دوم. چاپ هفتم .1376: 166-172.

4- قهرمان ا. آکروماتوسیت های ایران (سیستماتیک گیاهی). مرکز نشردانشگا هی. چاپ اول، 1373 : 87-85 .

5- مدرسی م، مصری پور م و رجائی ر. اثر عصاره هیدروالکلی دارچین Cinnamomum zeylanicum Nees بر تعداد سلول های اسپرماتوسیت و اسپرماتوزوآ در موش آزمایشگاهی. فصلنامۀ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. 1389: جلد 26 ، شمارۀ 1، 90-83.

6- نیکروش م، جلالی م، محمدی ش. بررسی اثر عصاره خام پیاز بر بافت بیضه موش. فصلن امه باروری و ناباروری 1388 : دوره 10 ، شماره 4، 239-244.

7- Duke JA, Bogen schutz, Godwin M.J, Du celliar J,Duke pk. Hand Book of Medicinal Herbs. second ed. 2002; Crcpress, Boca Roton, p. 314

8- Deng M, Song X Y, Tiang B. Effects of protopine on proliferation of cultured rabbit aortic vascular smooth muscle cells. Chin pharmacol. Bull, 2001; 17: 306 – 309.

9- Ko F N, Wu T S, Lu s u , Wu Yc, Huang T F, Teng c m . ca2+ channel blockade in rat thoracic aorta by protopine isolated from corydalis tubers. Jpn I pharma col, 1992; 58: 1 – 9.

10- Rice Ewans C A and Eurdon R.M. Free radical damage and it's control. Elsevier, Amsterdam, 1994; 113: 46-4.

11- hafizadeh F. popular Medicinal plants of lorestan. Tehran Hagan publication. 2002; p.128.

12- Suau R, Cabezudo B, Rico R, Najera F, Lopez-Romero JM. Direct determination of alkaloid content in Fumeria species by Gc-Ms. Phytochem Anal , 2002; 13 :363-367 .

13- Suan R. Alkaloids from Fumaria sepium and Fumaria agaria. Biochemical systematic and Ecology, 2003; 30: 263-265.

14- Haq LU, Hussain M. Medicinal plants of mansehra. Hmdard Medicas, 1993; 36:78-79.

15- Halliwell B and Gutterridge JMC. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease, An overview method in enzymology, 1989; 186: 1-85.

16- Hentschele, Presslers, Hahn. fumaria officinalis (fumitory). clinical applications Med, 1995; 113(19): 291-292.

17- Zargari A. medicinal plants.Tehran university publication, 1989; 2: 166 – 171.

18- Zargari A. medicinal plants. Sixth Ed. Tehran university press, 1990; 1 :72-166.