تأثیر عصاره الکلی میوه چریش (Melia indica L.) و زیتون تلخ (Melia azedarach L.) بر شاخص‌های باروری موش صحرایی

مهناز خانوی (Ph.D.)[1]، عباس حاجی آخوندی (Ph.D.)[1]، حمیدرضا صادقی‌پور رودسری (Ph.D.)[2]، محسن وثوقی (Ph.D.)[3]، روح‌الله اربابی (Ph.D.)[1]

۱ـ گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.

۲ـ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.

۳ـ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: افزایش سریع و نگران‌کننده جمعیت در جهان از یک سو و عوارض متعدد داروهای پیشگیری از بارداری در خانمها از سوی دیگر، تحقیقات جدید را جهت دستیابی و تولید داروهای ضد باروری مردان هدایت می‌کند. یکی از مواردی که در چند دهه اخیر در مورد آن مطالعات فراوانی انجام شده است ترکیبات موجود در عصاره حاصل از میوه و برگ درخت Melia indica یا Neem بوده که نتیجه بسیار خوبی از آن حاصل شده است. این گیاه، بومی کشور هند بوده و تحقیقات بسیار زیادی در مورد اثرات ضد باروری، اسپرم‌کشی، ضد قارچی و ضد دیابتی آن انجام شده است. لذا با توجه به وفور رویش Neem در جنوب ایران و وجود گونه مشابه، مختص شمال کشور به نام زیتون تلخ (Melia azedarach) و نظر به گزارشات متعدد اثرات میوه چریش بر شاخص‌های باروری، هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد باروری عصاره میوه این دو گونه گیاه در موش‌های صحرایی نر است.

روش بررسی: دوگونه مورد بررسی در این طرح، چریش با نام علمی Melia indica جمع‌آوری شده از بندر عباس و زیتون تلخ با نام علمی Melia azedarach جمع‌آوری شده از گرگان و از خانواده Meliaceae می‌باشد. پس از جمع‌آوری و شناسایی گیاهان فوق، به روش پرکوله از میوهٔ آنها عصاره هیدروالکلی گرفته شد و عصاره حاصله پس از تغلیظ با دوزهای ۵۰*mg/kg* و ۱۵۰ *mg/kg* به طور زیر جلدی (SC) به مدت ۶۰ روز به موش‌های صحرایی نر (Rat) ۶۵ـ ۵۵ روزه‌ای تزریق گردید که در حیوانخانه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای ۲۲ ℃ نگهداری می‌شدند. گروه شاهد هم شامل موش‌هایی بود که در طی همین مدت سرم فیزیولوژی (N.S) دریافت می‌کردند. ارزیابی شاخص‌های باروری از قبیل درصد تحرک اسپرم، درصد اسپرم‌های زنده، ذخیره اپیدیدیمی اسپرم (ESR)، تولید روزانه اسپرم (DSP)، نسبت وزن بیضه به کل بدن (GSI) و میزان باروری انجام گرفت. ارزیابی آماری با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس ANOVA و با استفاده از نرم افزار Prism انجام گرفت و حد خطای $p<0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار پذیرفته شد.

نتایج: نتایج حاصل از بررسی میزان درصد تحرک اسپرمها بین گروه شاهد و گروه عصاره چریش با دوز ۱۵۰*mg/kg* اختلاف معنی‌داری ($p<0/01$) با گروه شاهد و عصاره زیتون تلخ با دوزهای ۵۰*mg/kg* و ۱۵۰*mg/kg* نیز به ترتیب اختلاف معنی‌داری (به ترتیب $p<0/01$ و $p<0/05$) داشتند. با توجه به نتایج حاصل از بررسی تولید روزانه اسپرم توسط بیضه (برحسب گرم) بین گروه شاهد و عصاره زیتون تلخ با دوز ۱۵۰*mg/kg* اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) مشاهده گردید. از نظر میزان باروری موش‌های نر، بین گروه شاهد و عصاره چریش با دوز ۵۰*mg/kg* اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) وجود داشت و بین گروه شاهد و دوزهای ۵۰*mg/kg* و ۱۵۰*mg/kg* زیتون تلخ هر کدام اختلاف معنی‌داری ($p<0/01$) دیده شد. بنابراین، مطالعه فوق بیانگر کاهش میزان شاخص‌های باروری در گروه مصرف‌کننده عصاره چریش ($p<0/05$) و عصاره زیتون تلخ ($p<0/01$) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق تغییرات معنی‌داری را در کاهش میزان شاخص‌های باروری به ویژه در گروه دریافت‌کنندهٔ عصاره زیتون تلخ نشان داد. با توجه به ارزش ویژه چریش هند در اروپا و آمریکا به دلیل اثرات درمانی متعدد و وجود فرمولاسیون‌های دارویی مختلف آن در بازارهای جهانی، این دو گیاه قابل مطالعه و بررسی همه جانبه بوده و ارزش معرفی وسیعتر به جهانیان به عنوان ترکیباتی با اثرات احتمالی ضد باروری مردانه را دارند.

کلید واژگان: چریش، زیتون تلخ، پیشگیری از باروری، موش صحرایی، عصارهٔ میوه، اندکس‌های باروری، پیشگیری از باروری مردان، نیم، اسپرم، اسپرماتوژنز.

مسئول مکاتبه: دکتر عباس حاجی‌آخوندی، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵/۶۴۵۱، تهران، ایران .

پست الکترونیک: abbhadji@sina.tums.ac.ir

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

افزایش بی‌رویه جمعیت یکی از مشکلات کشورهای در حال توسعه می‌باشد و رشد فزاینده جمعیت برنامه‌ریزی در امور اقتصادی- اجتماعی و آموزشی را با مشکلاتی مواجه کرده است. کنترل جمعیت یکی از اهداف مهم در جهان امروز به حساب می‌آید و برنامه‌ریزی خانواده‌ها با استفاده از روش‌های پیشگیری مناسب دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. با توجه به عوارض جانبی متعدد داروهای ضد بارداری خوراکی شیمیایی موجود در بازار دارویی ایران و جهان (۱) و تمایل عموم مردم به مصرف داروهای گیاهی به دلیل عوارض کمتر، مطالعه روی گیاهان دارای اثرات ضد باروری ارزشمند می‌باشد.

یکی از گیاهان معروف در این زمینه که فرمولاسیون‌های[1] متعددی از آن در بازار دارویی جهان موجود است چریش[2] با نام علمی Melia indica است که بومی کشور هند می‌باشد (۳،۲) این گیاه در جنوب ایران به عنوان یک گیاه زینتی به وفور یافت می‌شود. همچنین گونه دیگری از این گیاه به نام زیتون تلخ[3] در شمال کشور به صورت بومی وجود دارد.

دو گیاه مذکور از تیره Meliaceae و راستهٔ Terebinthales می‌باشند. تیرهٔ Meliaceae شامل ٤٥ جنس و بیش از ۷۵۰ گونه به صورت درخت و یا درختچه‌هایی است که در نواحی گرمسیری می‌رویند. این تیره در ایران فقط دارای یک جنس به نام Melia می‌باشد که دوگونه چریش و زیتون تلخ، تنها گونه‌های شناخته شده موجود آن در کشور می‌باشند (٤،۲).

زیتون تلخ با نام علمی Melia azedarach L. درختی است با ارتفاع ۱۵-۱۰ متر که بومی نواحی هیمالیا می‌باشد؛ ولی در شمال کشور و جنگل‌های ساحلی دریای خزر، از لاهیجان و رامسر تا مازندران و میاندره گرگان انتشار دارد و در اطراف منازل روستایی دیده می‌شود و در بعضی باغها نیز به عنوان زینتی کاشته می‌شود (٦،٥).

آخرین پوستهٔ ریشهٔ درخت فعال‌ترین قسمت برای اهداف پزشکی و دارویی است. در طب سنتی غرب، گلها و برگچه‌های این درخت به طور موضعی برای درمان سردردهای عصبی استفاده می‌شوند و خمیر میوه و مرهم گلها برای از بین بردن شپش، سایر انگلها و جوش‌های سر به کار می‌روند. پوست درخت ضد کرم بوده در دوزهای بالا تهوع آور می‌باشد. میوه آن با طعمی شبیه ساخارین برای درمان جذام و سل غدد لنفاوی به کار می‌رود. با شکستن دانه‌ها، روغنی از آن به دست می‌آید که علاوه بر خاصیت ضد باروری و ضد انگلی به عنوان درمان موضعی عفونت‌های مفصل و زخم‌های مقاوم مفید می‌باشد (۳).

چریش با نام علمی Melia indica L. درختی است با ارتفاع ۱۵-۳۰m که قطر ساقهٔ آن حدود ۳۰-۹۰cm می‌باشد. این درخت بومی جنوب آسیا بوده و در هندوستان، پاکستان، سری لانکا، تایلند، مالزی و اندونزی پراکنده می‌باشد. در ایران نیز در نواحی گرمسیری جنوب کشور، از جمله بندر عباس و چابهار می‌روید (٦). همچنین این گیاه به صورت کشت شده در نواحی شمال غربی ایران و دشت مغان نیز کشت داده می‌شود (۷).

پوست درخت چریش در طب سنتی هند و چین برای درمان تب و گوشت میوه آن به عنوان داروی تقویتی استفاده می‌شود. هسته‌های چریش وقتی زیر آسیاب خرد و فشرده می‌شوند ۵۰-٤۰٪ روغن تولید می‌کنند که به عنوان ضدعفونی‌کننده زخم حیوانات، دافع حشرات، قارچ کش و نیز در لوازم آرایشی- بهداشتی استفاده می‌شود. پوست درخت، ایجاد کنندهٔ انقباض تونیک عضلانی است و برگچه‌های آن برای درمان تورم غدد لنفاوی و تاول مفید است (۳).

1- Formulation
2- Neem
3- Melia azedarach or Persian Lilac

Downloaded from http://www.jri.ir

تحقیقات علمی انجام شده نشانگر آن است که روغن میوه چریش اثر اسپرم‌کشی دارد و فرم‌های دارویی واژینال آن برای پیشگیری از بارداری استفاده می‌شود (۱۳-۸). پودر خشک برگ چریش روی کیسه منی اثر داشته و در تحقیقات Kasutri وهمکاران اثر آنتی‌آندروژنی برگ‌های چریش مشاهده شده است (۱٤).

چریش روی سیستم ایمنی اثر داشته و موجب افزایش PMN[1]، افزایش فعالیت ماکروفاژها و سلول‌های Th_1، تکثیر لنفوسیتها، افزایش لکوسیت‌های، دارای مارکر CD_4 و CD_8, گردیده و از طرف دیگر موجب تولید TNF_α و TNF_γ هم می‌شود (۱٥). روغن چریش به عنوان تحریک‌کننده غیراختصاصی سیستم ایمنی، به واسطه تغییرات میتوژنیک و آنتی‌ژنیک عمل می‌کند و فعالیت اختصاصی آن روی سلول‌های واسطهٔ ایمنی صورت می‌گیرد. همچنین عصاره برگ آن با اثر روی سلول‌های ایمنی باعث افزایش تیترIgM و IgG می‌شود (۱٦).

مطالعات متعددی در زمینه اثرات ممانعت کننده میوه چریش و زیتون تلخ بر روند بلوغ فولیکول‌های تخمدان موش صحرایی انجام شده که نشانگر اثر بازدارندهٔ قابل توجه این دو گیاه بر باروری موش صحرایی ماده می‌باشد (۱۷،۱۸). در ایران نیز مطالعه جامعی بر روی عصاره اتانولی میوه چریش منطقه دشت مغان انجام شده است که بیانگر اثرات مناسب این عصاره بر کاهش اسپرم در سلول‌های اپیدیدیم می‌باشد (۷).

با توجه به گزارش‌های متعدد اثرات ضد باروری گیاه چریش روی حیوانات مختلف با مکانیزم‌های متعدد از جمله اسپرم‌کشی، مهار تخمک‌گذاری و ممانعت‌کردن از جایگزینی جنین در هفته‌های نخستین بارداری (۱۳-۸) و مطالعات انجام شده در ایران مبنی بر اثرات کاهنده اسپرم عصاره اتانلی میوه M. indica (۷)، موجب جلب نظر سایر محققین ایرانی به این گیاه شده است. با توجه به اینکه چریش رویش یافته درجنوب و زیتون تلخ بومی شمال ایران تاکنون مورد مطالعه فراوان قرار نگرفته‌اند و نظر به ارزش فراوان این گیاهان به دلایل فوق، این مطالعه به بررسی اثر ضد باروری عصاره میوه این دو گونه گیاه رویش یافته در ایران روی موش‌های صحرایی نر پرداخته است.

روش بررسی

تحقیقات صورت گرفته در این مطالعه براساس پروتکل شمارهٔ MB-50 سازمان جهانی بهداشت انجام پذیرفته است (۱۹).

عصاره گیری: در این تحقیق میوه چریش در شهریور ماه ۱۳۸۳ از شهر بندرعباس، استان هرمزگان و میوه زیتون تلخ در آذرماه سال ۱۳۸۳ از جنگل‌های اطراف شهر گرگان، استان گلستان جمع‌آوری گردید. نمونه‌های هرباریومی جهت شناسایی، کدگذاری و نگهداری به هرباریوم دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران تحویل گردیدند (چریش با شماره .6640 THE و زیتون تلخ با شماره .6641 THE).

میوه‌ها در مجاورت هوا و دور از نور مستقیم خورشید خشک گردیدند. سپس دو کیلوگرم از هر یک از نمونه‌ها توسط دستگاه آسیاب نیمه صنعتی به خوبی خرد و به پرکولاتور منتقل گردید. عمل استخراج عصاره بوسیله اتانول ۸۵٪، چهار مرتبه و هر بار به کمک ۳ لیتر حلال، به مدت یک ماه برای هر یک از نمونه‌ها انجام گردید. به کمک دستگاه چرخان تقطیر در خلاء (Buchi, Germany) مدل RE 120، عصاره‌های حاصل تغلیظ و تا زمان انجام آزمایش در ظروف تیره و دربسته، در یخچال نگهداری گردیدند.

مواد و وسایل: مواد و وسایل مورد استفاده در این تحقیق به شرح زیر می‌باشد:

1- Poly Morphonuclear cell

Downloaded from http://www.jri.ir

موش صحرایی نر و ماده نژاد ویستار[1] خریداری شده از انستیتو پاستور ایران، پروپیلن گلیکول، NaCl، اتانول و رنگ ائوزین‌ـ نگروزین (Merck, Germany)، میکروسکوپ نوری (Zeise, Germany)، دستگاه چرخان تقطیر در خلاء و کیت رادیوایمونواسی (DRG, Germany).

حیوانات: از تعداد ٦٠ موش صحرایی نر بالغ و تعداد ٥٤ موش ماده بالغ از نژاد Wistar با محدوده وزنی ٢٥٠ -٣٠٠g و سن حدود ٦٥-٥٥ روز که قدرت باروری آنها به اثبات رسیده بود جهت انجام این تحقیق استفاده گردید. حیوانات در محل حیوانخانه دانشکده داروسازی تحت شرایط استاندارد دمایی ٢٦±٢ ℃، سیکل روشنایی/ تاریکی ١٢ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا به مدت چهار هفته نگهداری شدند.

گروه بندی حیوانات: تعداد ٦٠ موش نر که توانایی باروری آنها تأیید گردیده بود، به طور تصادفی به ٦ گروه ده تایی به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه الف- شامل: ١- گروه کنترل که ١ml/kg پروپیلن گلیکول به مدت ٦٠ روز از راه تزریق زیر جلدی (SC)[2] دریافت کردند. ٢- گروه دوم که به میزان ٥٠mg/kg عصاره میوه چریش جنوب به مدت ٦٠ روز از طریق تزریق زیرجلدی دریافت کردند. ٣- گروه سوم که به مقدار ١٥٠ mg/kg عصاره میوه چریش جنوب به مدت ٦٠ روز از طریق زیرجلدی دریافت کردند.

گروه ب- شامل: ١- گروه شاهد که ١ ml/kg نرمالین سالین ٠/٩٪ به مدت ٦٠ روز از طریق زیرجلدی دریافت کردند. ٢- گروهی که عصاره میوه زیتون تلخ شمال به مقدار ٥٠mg/kg به مدت ٦٠ روز از طریق تزریق زیرجلدی دریافت کردند. ٣- گروهی که عصاره میوه زیتون تلخ شمال به مقدار ١٥٠mg/kg به مدت ٦٠ روز از طریق تزریق زیرجلدی دریافت کردند.

نمونه‌گیری: ٢٤ ساعت بعد از آخرین تجویز ٦٠ روزه دارو، ٣ حیوان از هر گروه به طور تصادفی انتخاب شدند و هر کدام با ٣ موش ماده جوان و بالغ به مدت ١٢ روز برای جفت‌گیری هم قفس گردیدند تا توانایی باروری موش‌های نر بررسی شود[3]. سپس موش‌های باقیمانده از هر گروه بعد از وزن شدن بوسیله گیوتین کشته شدند و خون آنها در لوله آزمایش جهت تعیین تستوسترون جمع‌آوری گردید. در مرحله بعد شکم حیوان باز شد و اندام‌های تناسلی جهت بررسی شاخص‌هایی که در زیر به آنها پرداخته خواهد شد خارج گردید. این شاخصها از منابع معتبر انتخاب شدند و در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفتند (٢٠).

الف) بررسی تغییرات وزن بدن: باتوجه به اینکه میزان وزن موش‌های صحرایی یکی از شاخص‌های مهم در ارتباط با سلامتی حیوان می‌باشد، جهت بررسی اثرات احتمالی عصاره‌های مورد مصرف بر روندهای متابولیکی و یا ایجاد عارضه و نقص در روند رشد حیوان موش‌های هر گروه به طور منظم و روزانه توزین شدند و وزن آنها ثبت گردید تا وزن موش‌های هر گروه نسبت به گروه شاهد مقایسه شود.

ب) بررسی تغییرات وزن اپیدیدیم: به منظور بررسی اثرات احتمالی عصاره بر وزن اپیدیدیم، هر دو اپیدیدیم حیوان از بدن خارج و قطعات آن در سرم فیزیولوژی ٣٧ ℃ و در محیط انکوباتور غوطه‌ور شد. پس از خروج اسپرمها، قطعات اپیدیدیم توزین شد.

ج) بررسی تغییرات وزنی بیضه‌ها نسبت به وزن بدن (GSI)[4]: برای بررسی اثرات احتمالی عصاره بر وزن بیضه‌ها، هر دو بیضه حیوان خارج و درصد نسبت وزن دو بیضه به کل وزن حیوان محاسبه شد.

د) تعیین درصد تحرک اسپرماتوزوئیدها[5]: هر دو وازودفران در ٥ml محلول سرم فیزیولوژی ٣٧ ℃ به قطعات

1- Wistar
2- Subcutaneous
3- Mating test
4- Gonadosomatic Index
5- Motility

Downloaded from http://www.jri.ir

کوچک بریده شده و به آرامی تکان داده شد تا اسپرم‌های موجود در محلول شناور شوند. در بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها با بزرگنمایی ۴۰× درصد اسپرم‌های متحرک نسبت به کل تعداد اسپرم‌های موجود در میدان دید طی ۱۰ مرتبه محاسبه گردید.

د) تعیین درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده[1]: به کمک رنگ ائوزین- نگروزین و یک قطره از سوسپانسیون اسپرمی تهیه شده در مراحل فوق، اسمیر تهیه گردید. نظر به جذب رنگ توسط سیتوپلاسم سلول‌های مرده، گسترش تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰× مورد بررسی واقع شد و درصد اسپرم‌های زنده نسبت به تعداد کل اسپرم‌های موجود در میدان دید طی ۱۰ مرتبه محاسبه گردید.

و) تعیین میزان ذخیره اسپرمی اپیدیدیم (ESR)[2]: اپیدیدیم رت نر در ۲۰ml محلول سرم فیزیولوژیک ۳۷$^{\circ}C$ خرد و به مدت ۲۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷$^{\circ}C$ قرار داده شد. پس از همگن کردن نمونه، قطره‌ای از این سوسپانسیون اسپرمی روی لام توما قرار گرفت و بعد از گذشت ۲ دقیقه، با بزرگنمایی ۴۰× عمل شمارش برای هر نمونه انجام گردید. تعداد اسپرمها در هر گرم اپیدیدیم طی ۶ مرتبه محاسبه گردید (۲۱).

ز) تعیین میزان تولید روزانه اسپرم توسط بیضه‌ها (DSP)[3]: از مایع حاصل از هموژنیزه شدن بیضه‌ها رقت یک دهم تهیه و قطره‌ای از محلول حاصل بر روی لام نئوبار قرار داده شد. آنگاه بوسیله میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰× تعداد اسپرمها شمارش گردید. چون در موش صحرایی نر رشد اسپرماتوزوئیدها تقریباً ۶/۳ روز در حین اسپرماتوژنز طول می‌کشد، بنابراین پس از محاسبه تعداد کل اسپرماتوزوئیدها، آنرا بر عدد ۶/۳ تقسیم کرده تا میزان تولید در یک روز بدست آید.

ح) اندازه‌گیری تستوسترون سرم: جهت تعیین غلظت تستوسترون، خون جمع‌آوری شده در لوله آزمایش برای مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. سپس نمونه به دستگاه سانتریفوژ انتقال داده شده با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه، عمل جداسازی سرم انجام شد. برای تعیین تستوسترون سرم، از روش رادیوایمونواسی (RIA)[4] استفاده گردید.

ط) بررسی میزان باروری موش‌های نر[5]: در هر مرحله یک موش نر با ۳ موش ماده جوان و بالغ به مدت ۱۲ روز هم قفس گردیدند. بعد از گذشت این مدت موش‌های ماده جدا شدند و پس از ۱۲-۱۰ روز و کشتن آنها، با استفاده از لوپ نسبت تعداد جنین‌های موجود در رحم بر تعداد جسم‌های زرد موجود در تخمدان محاسبه گردید.

محاسبات آماری: ارزیابی آماری جهت بررسی اختلافات بین گروه‌های مورد و کنترل، با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و Newman-Keults post-hoc و با استفاده از نرم افزار Prism انجام گرفت و حد خطای $p<0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار پذیرفته شد.

نتایج

در جدول ۱ نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره میوه چریش (جنوب) و زیتون تلخ (شمال) بر شاخص‌های باروری در موش صحرایی نر، خلاصه شده است.

الف) اثر بر وزن بدن و نسبت وزنی بیضه ها بر وزن بدن (GSI): با توجه به نتایج حاصله، اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل و عصاره‌های گیاهی در هر یک از دو پارامتر فوق دیده نشد.

ب) اثر بر میزان تحرک اسپرمها: نتایج بدست آمده از بررسی میزان تحرک اسپرمها نشانگر آن بود که درصد تحرک اسپرمها بین گروه شاهد و گروه تحت تزریق عصاره چریش جنوب در غلظت ۵۰mg/kg با $p<0/05$ و

1- Viability
2- Epididymal Sperm Reserves
3- Daily Sperm Production
4- Radioimmunoassay
5- Fertility

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول۱- اثر عصارهٔ میوه چریش و زیتون تلخ (۱۵۰*mg/kg* و ۵۰) بر شاخص‌های باروری موش های صحرایی نر

گروهها	شاخصهای باروری							
	تفاوت وزن بدن (*g*)	میزان تولید روزانه اسپرم توسط بیضه GSI	تحرک (%)	Viability (%)	میزان ذخیره اسپرمی اپیدیدیم ESR/g (*million*)	تولید روزانه اسپرم به ازای هر گرم از وزن DSP/g.t (*million*)	تستوسترون (*ng/dl*)	میزان باروری (%)
شاهد (چریش)	۹/۰۰±٦/٦٦	۰/۹۰±۰/۰۲	۸۲/۵۷±۲/٦۲	۸٤/٤۰±۲/۹۷	۳۲۹/٦۰±٤۹/۲٤	۱۰/۰۸±۱/۱۱	۱۰٦/۰۰±۱۷/۷۸	۸۱/۵۵±۳/٤۰
عصارهٔ چریش (۵۰ *mg/kg*)	٦/۸۹±۱/۹٤ ***	۰/۸٤±۰/۰۵ ***	۵۲/۹۲±۳/۵۷ *	۵۸/٤٦±۳/۱۷ *	۲٤۷/٦٤±۵۰/۱۷ ***	۸/۵۱±۱/٦۱ ***	۱۲۹/۳۳±۵۲/٦۲ ***	۳۹/۱۱±۱۱/۳۱ *
عصارهٔ چریش (۱۵۰ *mg/kg*)	٤/۵٦±۱/۲۱ *	۰/۸۷±۰/۰۹ ***	**۳٦/۷۰±۸/۱۰	٤۳/۹۹±۸/٦۱ **	۲۲۱/۸۲±۵۲/٤٦ ***	۵/۹۱±۱/۲۷ ***	۱۲٤/۵٦±٦۰/۱٦۷ ***	۵٦/۵۵±۱٤/٦٤ ***
شاهد (زیتون تلخ)	۲٤/۰۰±۳/۷۹	۱/۱۳±۰/۰۲	۷۱/۲۰±۱/۳۳	۷۳/۱۸±۱/۳۱	٤۲٤/۵۰±۲٤/۹۷	۱۰/۳۹±۰/۷۱	۱۱۰/۳۳±۱۱/٦۷	٦۰/۰۸±۱۲/٤٦
عصارهٔ زیتون تلخ (۵۰ *mg/kg*)	۱۱/۱۱±۲/٤۲ **	۱/۰۸±۰/۰۳ ***	۵۹/۲۷±۱/۲۹ **	٦۱/۱۱±۱/۰۵ **	۳۱۰/۹۰±٤۸/۰٦ ***	۸/۵۳±۰/۷۹ ***	٦۷/۰۰±۲۰/۳۳ ***	۷/٦٤±۱/٦٤
عصارهٔ زیتون تلخ (۱۵۰ *mg/kg*)	۱۱/۳۸±٦/۰٤ *	۱/۰۱±۰/۰۵ ***	٦۳/۲۹±۱/۹٦ *	٦٦/۳۲±۲/۳٤ *	۳۷۰/۷۵±۵۰/٤۷ ***	٦/٦۱±۰/٦۲ *	۸۱/۲۵±۳۰/۰۱ ***	۱۳/۸۹±۹/۲۹ **

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** Not Significant

با مقدار ۱۵۰ *mg/kg* با $p<۰/۰۱$ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین عصاره زیتون تلخ نیز به مقدار ۵۰ *mg/kg* و ۱۵۰ *mg/kg* به ترتیب اختلاف معنی‌داری با $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۵$ داشتند.

ج) اثر بر قابلیت زنده ماندن اسپرمها: نتایج حاصل از بررسی قابلیت زنده ماندن اسپرمها نشان داد که درصد اسپرم‌های زنده بین دو گروه شاهد و عصاره چریش با دوز ۵۰*mg/kg* و ۱۵۰*mg/kg* به ترتیب اختلاف معنی‌داری با $p<۰/۰۵$ و $p<۰/۰۱$ و بین گروه شاهد و عصاره زیتون تلخ با دوز ۵۰*mg/kg* و ۱۵۰*mg/kg* به ترتیب اختلاف معنی‌داری با $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۵$ وجود دارد.

د) اثر بر میزان ذخیره اسپرمی اپیدیدیم (ESR/g): با توجه به نتایج حاصل، در میزان ذخیره اسپرمی اپیدیدیم (برحسب گرم) بین گروه‌های شاهد و عصاره‌های گیاهی اختلاف معنی‌داری دیده نشد.

ه) اثر بر میزان تولید روزانه اسپرم به ازاء هر گرم از وزن آن (DSP/gt): با توجه به نتایج حاصل از بررسی تولید روزانه اسپرم توسط بیضه (برحسب گرم در هر روز) اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و حلال مشاهده نشد، ولی بین گروه شاهد و عصاره زیتون تلخ با دوز ۱۵۰ *mg/kg* اختلاف معنی‌داری با $p<۰/۰۵$ مشاهده گردید. بین گروه‌های دیگر با شاهد و حلال اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

و) اثر بر میزان باروری موش‌های نر: با توجه به نتایج حاصل از این آزمون اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و عصاره چریش با دوز ۵۰ *mg/kg* اختلاف معنی‌داری با $p<۰/۰۵$ وجود داشت و بین گروه شاهد وعصاره‌های زیتون تلخ هر کدام اختلاف معنی‌داری با $p<۰/۰۱$ دیده شد.

ز) اثر بر میزان تستوسترون سرم: نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار تستوسترون سرم نشان داد که هیچگونه اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد و حلال و همچنین بین گروه شاهد و عصاره‌های گیاهی وجود ندارد.

بحث

نتایج حاصل از آزمایشات مختلف در این مطالعه، بیانگر تأثیر عصاره‌های حاصل از میوهٔ درخت چریش جنوب و به ویژه زیتون تلخ شمال بر فرآیند باروری در موش صحرایی نر می‌باشد.

با توجه به کاهش اختلاف وزن در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده عصاره، می‌توان نتیجه گرفت که عصاره‌های تهیه شده در مقادیر تجویز شده در این

Downloaded from http://www.jri.ir

تحقیق، در روند متابولیسم عمومی بدن تأثیر داشته است. به طوری که افزایش وزن موش‌های دریافت‌کننده چریش جنوب با دوز ۱۵۰ *mg/kg* و عصاره‌های زیتون تلخ نسبت به گروه‌های شاهد کاهش یافته است؛ ولی در مطالعات ماکروسکوپی هیچگونه تغییری در وضعیت احشاء مشاهده نگردید.

مطالعات Raji و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که تزریق داخل صفاقی عصاره چریش به مدت ۱۰ هفته و به میزان ۱۵۰ *mg/kg*، باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در وزن بیضه‌ها، اپیدیدیم، سمینال وزیکول، تعداد اسپرم، قابلیت زنده ماندن[1]، تستوسترون، LH و باروری شده بود که این تغییرات با بزرگ شدن اندازه غده آدرنال و ثابت ماندن میزان FSH همراه بود (۲۲).

در مطالعه حاضر گروه‌های دریافت‌کنندهٔ عصاره، کاهش معنی‌داری در GSI نداشتند؛ که باتوجه به کاهش وزن بدن و کاهش وزن اپیدیدیمها این امر طبیعی می‌باشد. میزان تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرمها در هر دو عصاره چریش جنوب و زیتون تلخ شمال کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد داشتند. با توجه به اینکه هرگونه تغییر در عملکرد سلول‌های اپیدیدیم می‌تواند باعث تغییراتی در این دو شاخص گردد لذا به نظر می‌رسد این دو عصاره سبب اختلال در عملکرد ترشحی و جذبی اپیدیدیم و اختلال در بلوغ اسپرمها گردیده باشد (۲۵-۲۳).

Capi و همکاران در سال ۱۹۸۵ نشان دادند که عصاره چریش در کمتر از ۳۰ ثانیه می‌تواند اسپرم حیوان و انسان را کاملاً از بین ببرد و لذا به عنوان یک روش پیشگیری از بارداری از آن می‌توان استفاده کرد. تحقیقات آنها نشان داد که عصاره چریش در صورتی که بین روزهای ۷-۲ بعداز بارداری ناخواسته از طریق واژینال استفاده گردد، با کاهش غلظت استروژن، سبب جلوگیری از جایگزینی تخمک لقاح یافته شده[2] و موجب سقط جنین می‌گردد (۲۷،۲۶).

از سوی دیگر، عدم کاهش معنی‌دار در میزان تستوسترون سرم، ذخیره اسپرمی اپیدیدیم (ESR) و تولید روزانه اسپرم (DSP) در اکثر گروه‌ها، مؤید این نظر می‌باشد که این دو عصاره در سطح بیضه و بر سلول‌های لایدیگ تأثیری نداشته و همچنین اثر نامطلوبی بر کاهش GnRH، صفات ثانویه جنسی و میل جنسی نداشته‌اند (منطبق با مشاهدات می‌باشد) که به عنوان یک مزیت می‌توان از آن نام برد.

در مطالعاتی که دانشمندان هندی در زمینه خاصیت ناباروری عصاره چریش انجام داده‌اند ۸۰٪ ناباروری بعد از ۹ هفته و ۱۰۰٪ ناباروری بعد از ۱۱ هفته از مصرف خوراکی عصاره آبی برگ درخت چریش در موش صحرایی نر مشاهده شده است، بدون آنکه عصاره فوق تأثیری منفی بر فرآیند تولید اسپرم و میل جنسی داشته باشد (۲۸).

نتایج حاصل از بررسی میزان باروری، بیانگر کاهش معنی‌دار در میزان باروری در عصاره چریش جنوب به مقدار ۵۰*mg/kg* با $p<0/05$ و عصاره‌های زیتون تلخ شمال با $p<0/01$ بود. بررسی تمامی فاکتورها در جدول فوق نشان داد که عصاره با غلظت ۵۰ *mg/kg*، تأثیر بیشتری در ایجاد ناباروری دارد.

مطالعات Upadhyay و همکاران در سال ۱۹۹۳ نشان داد که تزریق ۵۰ *μl* از عصاره چریش به صورت دوز واحد[3] در مجرای وازودفران موش صحرایی نر موجب عقیم گشتن کامل موشها به مدت ۸ ماه گردد بدون آنکه التهاب و یا انسدادی در اپیدیدیم و وازودفران دیده شود. در آن پژوهش فرآیند اسپرماتوژنز بدون تأثیر بر میزان تستوسترون کاملاً مهار شد و هیچ آنتی‌بادی ضداسپرم در سرم مشاهده نشد. در ضمن مهار اسپرماتوژنز فقط در قسمتی دیده شد که عصاره چریش در وازودفران همان ناحیه تزریق شده بود (۲۹).

1- Viability
2- Implantation
3- Single dose

Downloaded from http://www.jri.ir

طبق مطالعات گروه فوق، تزریق عصاره چریش به میزان ۱۰۰μl به صورت دوز واحد در داخل رحم رت‌های ماده، باعث ایجاد عقیمی ۱۸۰-۱۰۷ روزه بدون ایجاد اثرات تراتوژنیک و عارضه‌ای سوء روی رحم و فعالیت تخمدان گشت (۸).

البته در بعضی مقالات مکانیسم اثر عصاره چریش در ایجاد ناباروری را کاهش میزان پروژسترون و در بعضی دیگر اثر بر فاکتورهای سیستم ایمنی و فعال شدن لنفوسیت‌های T دانسته‌اند؛ ولی مکانیسم دقیق آن هنوز مشخص نشده است (۳،۲٤).

در ایران نیز مطالعه جامعی روی عصاره اتانولی میوه چریش منطقه دشت مغان انجام شده است که بیانگر اثرات مناسب این عصاره بر کاهش فعالیت ATPase، کاهش حرکت اسپرم در مجاری اپیدیدیم و ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در ساختمان اسپرم می‌باشد (۷).

با توجه به مطالعات فیتوشیمی و بررسی شیمیایی ترکیبات موجود در زیتون تلخ و چریش، ترکیبات مشترک زیادی دیده می‌شود؛ ولی مقادیر این مواد متفاوت می‌باشد؛ به شکلی که اسید کاپروئیک، اسید پالمیتیک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک، اسید لینولنیک، اسیدهای چرب اصلی هر دو گیاه می‌باشند؛ ولی اسید فوماریک به طور اختصاصی در زیتون تلخ و اسید واکسنیک و اسید بنزوئیک به طور اختصاصی در چریش یافت شدند (۳۰). به نظر می‌رسد که اختلاف در مقادیر و نوع اسیدهای چرب و سایر ترکیبات موجود در گیاه که به علت شرایط مختلف جغرافیایی، آب و هوایی، ژنتیکی و گونه‌ای می‌باشد، اصلی‌ترین عامل در بروز تفاوت اثر بین عصارهٔ زیتون تلخ شمال و چریش جنوب باشد.

نتیجه‌گیری

کاهش چشمگیر در تحرک و قابلیت زنده ماندن اسپرم و باروری موش‌های نر پس از مصرف هر دو گونه گیاه و کاهش تولید روزانه اسپرم، نشانگر مناسب بودن این دو گیاه، خصوصاً زیتون تلخ شمال به عنوان ماده‌ای پیشگیری کننده از بارداری می‌باشد که خود مؤید اطلاعات موجود در طب سنتی آسیا و خصوصاً هندوستان در زمینه مصرف این گیاه به عنوان ضدبارداری است.

با توجه به آزمون‌های انجام شده بر روی حیوانات متعدد مبنی بر اثر مناسب این گیاه به عنوان داروی پیشگیری از بارداری، پاسخ آزمون‌های LD50 و در نظر گرفتن مطالعات انجام شده در این تحقیق و سایر موارد ذکر شده، به نظر می‌رسد که عصاره میوه چریش و به ویژه زیتون تلخ، دارای اثرات بارز و بسیار ویژه‌ای در ایجاد ناباروری در جنس نر می‌باشد که ارزش بررسی‌های جامع‌تر جهت آزمایش بر روی انسان به عنوان داروی ضد باروری جنس ذکور را نیز دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران می‌باشد. بدینوسیله نویسندگان، مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولان محترم آن دانشگاه اعلام می‌دارند. همچنین از جناب آقای دکتر محمد هادی سلیمانی و عزیزان مسئول در کشت و صنعت گیاه اسانس به پاس مساعدت در تهیه نمونه گیاهان مورد آزمایش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1- Moore PJ, Adler NE, Kegeles SM. Adolescents and the contraceptive pill: the impact of beliefs on intentions

Downloaded from http://www.jri.ir

dirachta Indica (Neem): Mechanisms involved. Am J Reprod Immunol. 1997;37:485-91.

16- Upadhyay SN, Dhawan S, Garg S, Talwar GP. Immunomodulatory effects of neem (Azadirachta indica) oil. Int J Immunopharmacol. 1992;14:1187-93.

17- Roop JK, Dhaliwal PK, Guraya SS. Extracts of Azadirachta indica and Melia azedarach seeds inhibit folliculogenesis in albino rats. Brazilian J Med Biol Res. 2005;38:943-7.

18- Dhaliwal PK, Roop JK, Guraya SS. Ecological Agriculture and Sustainable Development. 1Th Edition, Published by Indian Ecological Society and Centre for Research in Rural and Industrial Development, Chandigarh, India. 1998;pp:734-5.

19- WHO. A method for examination of the effect of plant extracts administered orally on the fertility of male rats. APF/IP, 99/4E, MB-50 1-12 1983.

۲۰- سیمی سیروس. ارزیابی اثرات ضد باروری ترکیبات دی هیدروپریدینی در موش صحرایی نر. شماره پایان نامه ٤٤٣٠. دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران (۸۳ - ۱۳۸۲)، صفحات: ۱۲٦-۸۸.

21- Majumder GC. Occurrence of a cyclic AMP- dependent protein kinas of the uter surface of rat epididymal spermatozoa. Biochem J. 1980;54:737-47.

22- Raji Y, Udoh US, Mewoyeka OO, Ononye FC, Bolarinwa AF. Implication of Reproductive endocrine malfunction in male antifertility efficacy of Azadirachta indica extract in Rats. Afr J Med Med Sci. 2003;32 (2):159-65.

23- Carr DW, Usselman MC, Acott TS. Effects of pH, lactate and viscoelastic drug on sperm motility: a species comparison. Biol Reprod. 1985;33(3):588-95.

24- Tash JS, Kakar SS, Means AR. Flagellar motility requires the cAMP-dependent phosphorylation of a heat-stable NP-40- Soluble 56 kd protein, axokinin. Cell. 1984;38(2):551-9.

25- Mukherjee S, Garg S, Talwar GP. Early post implantation contraceptive effects of a purified fraction of Neem (Azadirachta indica) seeds, given orally in rats; possible mechanisms involved. J Ethnopharmacol. 1999;67(3):287-96.

26- Sinha KC, Riar SS, Tiwary RS. Neem oil an vaginal contraceptive. Indian J Med Res. 1984;79(1): 131-6.

27- Keshri G, Bajpai M, Lakshmi V, Setty BS, Gupta G. Role of energy metabolism in the pregnancy interceptive action of Ferula assafoetida and Meliaazedarach extracts in rat. Contraception. 2004;70(5):429-32.

28- Deshpande VY, Mendulkar KN, Sadre NL. Male antifertility activity of Azadirachta indica in mice. J Postgrad Med. 1980;26(3):167-70.

and use. Obstet Gynecol. 1996;88(suppl):48S-56S.

۲ - قهرمان احمد. کروموفیت‌های ایران. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی تهران (۱۳۷۳)، صفحات: ٤٤-۳۲۸.

3- Rair SS, Bardham J, Thomas P, Kian AK, Parshad R. Mechanism of antifertility action of Neem oil. Indian J Med Res. 1988;88:339-42.

٤- مظفریان ولی الله. فرهنگ نامهای گیاهان دارویی. فرهنگ معاصر (۱۳۷۵)، صفحه: ۳٤۳.

٥ - قهرمان احمد. فلور رنگی ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع (۱۳٦٥)، جلد هشتم، صفحات: ٦-۹٥٥.

٦- ثابتی حمیدرضا. جنگلها و درختچه‌های ایران. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه یزد (۱۳۷۳)، صفحه: ۸۱۰.

7- Dehghan MH, Martin T, Dehghanan R. Antifertility effect of Iranian neem seed alcoholic extract on epididymal sperm of mice. Iranian J Reprod Med. 2005;3 (2):83-9.

8- Upadhyay SN, Kayshic C, Talwar GP. Antifertility effect of Neem (Azadirachta indica) oil by single intrauterine administration: a novel method for contraception. Proc Biol Sci. 1990;242(1305):175-9.

9- Sairam M, Ilavazhagan G, Sharma SK, Dhanraj SA, Suresh B, Parida MM, Jana AM, Dewendra K, Selvamurthy W. Anti- microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (Azadirachta indica). J Ethnopharmacol. 2000;71(3):377-82.

10- Garg S, Doncel G, Charba S, Upadhyay SN, Talwar GP. Synergistic spermicidal activity of neem seed extract, reetha saponins and quinine hydrochloride. Contraception. 1994;50(2):185-90.

11- Bardhan J, Riar SS, Sawhney RC, Kain AK, Thomas P, Ilavazhagan G. Neem oil a fertility controlling agent in rhesus monkey. Indian J Physiol Pharmacol. 1991; 35(4):278-80.

12- Riar SS, Devakumar C, Ilavazhagan G, Bardhan J, Kain AK, Thomas P, Singh R, Singh B. Volatile fraction of neem oil as a spermicide. Contraception. 1990; 42(2):479-87.

13- Riar SS, Devakumar C, Sawhney RC, Ilavazhagan G, Bardhan J, Kain AK, Thomas P, Parshad R. Antifertility activity of volatile fraction of neem oil. Contraception. 1991;43(3):319-26.

14- Kasutri M, Ahmad RN, Pathan KM, Shaikh PD, Manivannan B. Effect of Azadirachta indica leaves on the seminal vesicles and ventral prostate in Albina Rats. Indian J Physiol pharmacol. 1997;41(3):234-40.

15- Talwar GP, Shah S, Mukherjee S, Chabra R. Induced termination of pregnancy by purified extracts of Aza-

Downloaded from http://www.jri.ir

۳۰- کاظمی مطهره. مقایسه فیتوشیمی و اثر ضد لارو عصاره میوه چریش جنوب و زیتون تلخ شمال ایران. شماره پایان نامه ٤٤١١. دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران (۸۲-۱۳۸۱)، صفحات: ۲۲-۱.

29- Upadhyay SN, Dhawan S, Talwar GP. Antifertility effect of Neem (Azadirachta indica) oil in male rats by single intra-vas administration: an altemate approach to vasectomy. J Androl. 1993;14(4):275-81.

Downloaded from http://www.jri.ir