

اثرات عقیم سازی عصاره گیاه چریش روی موش صحرائی نر

معصومه محمودی میمند^۱(M.S.)، محسن مروتی^۲(Ph.D.)، محمود قاضی خوانساری^۳(Ph.D.)، بتول نصرالله زاده^۴(Ph.D.)، باقر مینایی^۵(Ph.D.)

- ۱- مربی، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.
- ۲- عضو هیات علمی، بخش تحقیقات آفت کشها، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، تهران، ایران.
- ۳- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.
- ۴- دانشیار، گروه جنین شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.
- ۵- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

امروزه به دلیل مشکلات متعدد ناشی از آفت‌کشیهای سنتزی تلاش بر این است تا آفت‌کشیهای بیولوژیک و طبیعی جایگزین آنها گردد. از جمله این موارد استفاده از فرآورده‌های گیاهی است. گونه گیاهی *Azadirachta indica* - چریش- از جمله گیاهان با ارزشی است که مطالعات متعدد روی عصاره مغز دانه آن اثرات ضد باروری و سقط جنینی موقت و قابل بازگشت آن را در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسانده است. لذا بر آن شدیم تا ضمن مطالعه این ویژگی، میزان دوز مؤثر جهت عقیم‌سازی دائم جوندگان برای کنترل جمعیت آنها را بدست آوریم. در این بررسی ۲۴ موش صحرائی نر نژاد (Wistar) ۵-۴ ماهه (با وزن ۲۰۰-۱۵۰ گرم) بصورت تصادفی انتخاب شده و به ۴ گروه شامل ۶ موش تقسیم شدند. به گروه اول آب و به سه گروه دیگر به ترتیب 10mg/kg ، 20mg/kg و 40mg/kg عصاره گیاه چریش (عصاره تجاری Neemazal با مقدار آزادیراکتین ۱٪) به مدت ۶ روز متوالی به روش گاواژ خورانده شد. در روزهای چهارم و نهم آزمایش، از تمام گروه‌ها خونگیری و بررسیهای هماتولوژیکی و سرمی (هورمون تستوسترون) انجام شد. در روز دهم آزمایش دو حیوان از هر گروه آزمایشی تشریح شدند تا بررسیهای بافت‌شناسی بر روی بیضه آنها انجام شود. سپس حیوانات باقیمانده گروه برای تست باروری در کنار موشهای صحرائی ماده بالغ قرار گرفتند. بعد از مشاهده تکثیر در حیوانات ماده، این گروهها از مراحل آزمایش خارج شدند. مقادیر MCH، هموگلوبین گروه سوم در مرحله اول ($P < 0/05$) و مرحله دوم (به ترتیب $P < 0/01$ و $P < 0/01$) و مقدار گلبولهای سفید گروه سوم در مرحله دوم ($P < 0/05$) نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد. اما در مورد مقادیر سایر فاکتورهای بررسی شده، بین نمونه‌های کنترل و آزمایش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بین مقدار هورمون تستوسترون گروههای کنترل و آزمایش اختلاف معنی‌داری دیده نشد. موشهای ماده مجاور شده با گروهی که 10mg/kg عصاره گیاه چریش دریافت کرده بودند پس از گذشت ۶۰ روز زایمان نمودند (دوره بارداری این حیوانات ۲۲-۲۰ روز است). در گروهی که 20mg/kg عصاره دریافت کردند نیمی از حیوانات تحت آزمایش به علت تجویز دوز بالای عصاره تلف شده و در نیم دیگر آنها پس از گذشت ۳ ماه تولیدمثل دیده شد. نتایج بررسیهای بافت‌شناسی هم بیانگر ایجاد تغییراتی در سیر اسپرماتوزن، شامل از بین رفتن اسپرماتوزوئیدها، تولید اسپرم‌های غیرطبیعی و پرخونی بافت بینابینی در برخی توبولهای اسپرم‌ساز بود. لذا با گذشت زمان (۹۰-۶۰ روز) و ترمیم سلولهای آسیب دیده مجدداً تولیدمثل دیده می‌شود. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد که بتوان از عصاره این گیاه بعنوان عامل ضدباروری استفاده کرد، تحقیقات بیشتر و لحاظ مسائلی همچون به صرفه‌بودن اقتصادی، فرمولاسیون مناسب آنرا تهیه و در طعمه حیوانات مورد استفاده قرار داد و بدین طریق، روشی جدید در کنترل نسل و ازدیاد تعداد جوندگان مضر کشاورزی ارائه نمود.

کل واژگان: چریش (*Azadirachta indica*)، ضد باروری، اسپرماتوزن، اسپرماتوزوئید، موش صحرائی و آفت‌کشها.

آدرس مکاتبه: معصومه محمودی میمند، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، تهران، ایران.

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

مقدمه

همواره جوندگان بعنوان آفات کشاورزی مطرح می‌باشند. مطالعات زیادی برای یافتن راه‌های مناسب کنترل آنها صورت گرفته است. در اغلب موارد برای کنترل آنها از مواد سنتزی و شیمیایی استفاده می‌شود، اما طی نیم قرن گذشته استفاده از آفت‌کشهای سنتزی اغلب بدون دقت و بی‌رویه بوده که منجر به مسائل و مشکلات زیست محیطی زیادی از جمله: آلودگی مواد غذایی، خاک، آبهای سطحی و زیرزمینی، آلودگی هوا و... شده است. به این مشکلات میتوان باقیمانده سموم، عوارض سوء بر حشرات و سایر موجودات زنده غیرهدف، افزایش تعداد آفات مقاوم به آفت‌کشها و طغیان مجدد آفات را نیز افزود(۱).

امروزه در تمام کشورها آگاهی افراد نسبت به مسائل زیست محیطی و اثرات جانبی مرتبط با استفاده از آفت‌کشهای سنتزی رو به افزایش است، لذا سعی بر این است تا با جایگزین کردن آفت‌کشهای بیولوژیک و طبیعی به جای انواع سنتزی، گامی در جهت حفظ محیط زیست و سلامت انسان برداشته شود. از جمله این موارد استفاده از فرآورده‌های گیاهی است که برای حفاظت گیاهان در مقابل آفات و بیماریها مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از خانواده‌های گیاهی که دارای ویژگیهای متعدد و از جمله اثر بر آفات و حشرات است خانواده ملیاسه^۱ (شال سنجد) می‌باشد. یکی از گونه‌های این خانواده بنام چریش^۲ گیاه بومی شبه قاره هند با ویژگیهای دارویی بسیار زیاد بوده که از قرن‌ها پیش در طب سنتی مردم این سرزمین مورد استفاده بوده است. در حال حاضر به علت موارد کاربرد متعدد آن در تمام مناطق دنیا بعنوان یک درخت اعجاب انگیز مورد قبول واقع شده است(۲). ترکیبات مختلف گیاه چریش سالها است که مورد شناسائی قرار گرفته است. این ترکیبات دارای خواص ضد ویروسی، ضدباکتریایی، ضد قارچی،

ضدالتهاب و ضدتب می‌باشند(۳-۵). پلی‌ساکاریدهای حاصل از عصاره آبی پوست ساقه درخت دارای خواص ضد توموری بوده و باعث القای اینترفرون می‌گردد(۶). در ارتباط با تولید مثل، اثرات ضد باروری روغن چریش ابتدا توسط Lal و همکارانش گزارش شد(۷). عصاره مغز دانه چریش اثرات ضد باروری و سقط جنینی موقت و قابل بازگشتی دارد که مطالعات متعدد روی حیوانات آزمایشگاهی آنها به اثبات رسانده است و در حال حاضر نیز در کشور هندوستان از عصاره آن جهت ساخت قرص‌های ضدباروری برای انسان استفاده می‌شود(۸). لذا با توجه به ویژگی‌های این گیاه، در این تحقیق سعی شده است تا ضمن مطالعه خاصیت ضدباروری دائم عصاره چریش روی موش صحرایی، میزان دوز مؤثر آن جهت عقیم‌سازی دائم جوندگان بررسی شود.

مواد و روشها

برای انجام این مطالعه ۲۴ موش صحرایی نژاد Wistar با سن ۵-۴ ماه و وزن ۲۰۰-۱۵۰ گرم از بصورت تصادفی انتخاب و به ۴ گروه ۶ عددی تقسیم شدند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که فقط آب دریافت کردند و سه گروه دیگر، گروههای اول، دوم و سوم آزمایش به ترتیب دوزهای ۰/۱۸ml، ۰/۳ml و ۰/۵ml عصاره گیاه چریش (عصاره تجاری Neemazal با مقدار آزادیراکتین ۱٪) دریافت نمودند. تجویز عصاره و آب به این گروهها با استفاده از سوزن مخصوص گاواژ موش صحرایی انجام شد. از نظر حجمی، تمام حیوانات حجم مساوی مایع دریافت کردند. به این ترتیب که گروه شاهد: ۰/۵ml آب، گروه اول: ۰/۴ml همراه با عصاره ۰/۱ml، گروه دوم: آب ۰/۲ml همراه با عصاره ۰/۳ml و گروه سوم: ۰/۵ml عصاره دریافت کردند. گاواژ کردن حیوانات به مدت ۶ روز متوالی انجام شد.

1-Meliacea
2-Azadirachta indica

جدول ۱- توزیع فاکتورهای هماتولوژیک در گروههای آزمایش و شاهد موشهای صحرایی دریافت‌کننده عصاره گیاه چربش (مرحله اول: روز چهارم آزمایش)

گروههای آزمایشی				فاکتورهای هماتولوژیک
سوم (۲۵ mg/kg)	دوم (۱۵ mg/kg)	اول (۵ mg/kg)	کنترل	
۸/۲۵±۱/۴۰	۸/۶۰±۱/۴۱	۱۲/۹۷±۱/۵۹	۹/۷۴±۲/۶۲	WBC(M/mm ³)
۷/۶۵±۰/۱۸	۷/۶۱±۰/۱۶	۷/۶۷±۰/۱۲	۷/۰۸±۰/۱۷	RBC(M/mm ³)
۱۶/۵۰±۰/۳۴*	۱۵/۲۷±۰/۳۹	۱۵/۷۶±۰/۳۹	۱۳/۹۸±۰/۴۵	Hb(g/dl)
۵۵/۰۰±۱/۰۸	۵۳/۱۱±۰/۵۲	۵۳/۰۰±۱/۰۳	۵۳/۰۸±۰/۷۶	MCV(fl)
۲۱/۵۶±۰/۴۳*	۲۰/۰۱±۰/۲۴	۲۰/۰۱±۰/۲۱	۱۹/۷۶±۰/۳۶	MCH(Pg)
۳۹/۲۰±۰/۴۰	۳۷/۷۳±۰/۲۳	۳۷/۹۳±۰/۱۱	۳۷/۲۲±۰/۱۹	MCHC(g/dl)
۴۲/۰۰±۰/۴۳	۴۰/۴۶±۰/۹۱	۴۰/۴۶±۰/۵۸	۳۷/۶۰±۱/۱۱	Hct(%)
۸۸/۱۰±۲/۷۹	۶۷/۸۷±۲/۶۰	۷۳/۰۸±۲/۲۷	۶۸/۶۰±۲/۸۴	Lym(%)

مقادیر جدول M±SD در ۶-۵ موش صحرایی می‌باشند.

نمونه‌ها با استفاده از کیت تستوسترون (DRG Diagnostics, Germany) و دستگاه الیزا مقدار هورمون سنجش شد.

اندازه‌گیری تستوسترون: ۲۵ μl از نمونه، کنترل و استاندارد با ۲۰۰ μl - کونژوگه آنزیمی به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط شد و در دمای اتاق برای مدت یک ساعت روی روتاتور انکوبه گردید. چاهک‌ها^۱ با استفاده از ۴۰۰ μl محلول شستشوی رقیق سه بار شستشو گردید. ۲۰۰ μl محلول سوبسترا به آن اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه آنکوباسیون در دمای اتاق واکنش آنزیمی با افزودن ۱۰۰ μl محلول اسیدی متوقف گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الیزا در طول موج ۴۵۰ nm قرائت گردیده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌های مجهول تعیین گردید.

در روز نهم (دو روز پس از پایان گاوژ) مجدداً خونگیری از تمام حیوانات صورت گرفته، آزمایشات مذکور انجام شد.

در روز دهم آزمایش، دو حیوان از هر یک از گروههای فوق تشریح شده و بیضه‌های آنها برای انجام بررسیهای بافت‌شناسی جدا گردید. در روز پانزدهم، به

در روز چهارم آزمایش، از حیوانات تمام گروهها خونگیری شد. آزمایشات هماتولوژی و اندازه‌گیری ترکیبات سرم بر روی این خون انجام گرفت. به منظور انجام آزمایشات هماتولوژی (CBC)^۱، خون در ویالهای محتوی یک قطره EDTA^۲ ۲٪ جمع آوری شد و سپس با استفاده از دستگاه Cell Counter (دستگاه MS9 که ساخت کشور فرانسه V.Cedex, Version 3.5XXE) فاکتورهای هماتولوژیکی شامل: تعداد گلبولهای سفید (WBC)^۳، تعداد گلبولهای قرمز (RBC)^۴، هموگلوبین (Hb)^۵، حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)^۶، مقدار متوسط هموگلوبین سلولی (MCH)^۷، مقدار متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC)^۸، هماتوکریت و لنفوسیت مورد بررسی قرار گرفت. بخش دیگری از خون برای تهیه سرم در ویالهای بدون EDTA جمع‌آوری گردید. سرم حاصل در دمای ۲۰°C- نگهداری و در پایان آزمایشات و جمع‌آوری تمام

- 1-Complete Blood Cell Count
- 2-Ethylenediamine Tetraacetic Acid
- 3-White Blood Cell
- 4-Red Blood Cell
- 5-Hemogolobin
- 6-Mean Cell Volume
- 7-Mean Corpuscular Hemoglobin
- 8-Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

9-Microwell

جدول ۲- توزیع فاکتورهای هماتولوژیک در گروههای آزمایش و شاهد موشهای صحرایی دریافت‌کننده عصاره گیاه چربش (مرحله دوم: روز نهم آزمایش)

گروههای آزمایشی				فاکتورهای هماتولوژیک
سوم (۲۵ mg/kg)	دوم (۱۵ mg/kg)	اول (۵ mg/kg)	کنترل	
۱۱/۸۷±۱/۳*	۸/۷۸±۰/۷۲	۹/۹۰±۱/۶۰	۵/۹۴±۱/۲۰	WBC(M/mm ³)
۷/۴۳±۰/۱۸	۷/۳۶±۰/۱۷	۷/۴۶±۰/۰۸	۷/۲۰±۰/۱۰	RBC(M/mm ³)
۱۵/۸۷±۰/۲۶**	۱۴/۰۶±۰/۳۵	۱۴/۱۵±۰/۲۱	۱۳/۵۶±۰/۳۶	Hb(g/dl)
۵۵/۳۲±۰/۹۴	۵۲/۶۱±۰/۵۶	۵۳/۱۸±۰/۳۵	۳۵/۸۰±۰/۶۳	MCV(fl)
۲۱/۳۷±۰/۳۰**	۱۹/۱۰±۰/۲۰	۱۸/۴۵±۰/۴۴	۱۸/۹۰±۰/۴۷	MCH(Pg)
۲۸/۱۷±۰/۲۵	۲۸/۹۰±۰/۲۵	۳۵/۶۲±۰/۳۰	۳۵/۱۰±۰/۶۳	MCHC(g/dl)
۴۱/۰۷±۰/۴۴	۲۸/۷۰±۰/۶۸	۲۹/۶۸±۰/۵۸	۳۷/۸۶±۰/۶۳	Hct(%)
۸۵/۸۵±۱/۲۳	۸۴/۷۱±۱/۶۲	۸۳/۳۵±۱/۶۵	۸۳/۱۰±۱/۷۴	Lym(%)

مقادیر جدول M±SD در ۶-۵ موش صحرایی می‌باشند.

مقادیر فوق از نظر معنی‌دار بودن نسبت به گروه کنترل مقایسه شده‌اند $P < 0.05$ ، * $P < 0.01$ ، ** $P < 0.001$.

شدند.

بررسیهای بافت شناسی: پس از تشریح حیوانات، بیضه جداسازی شده و بافت به مدت ۱۰-۷ روز در فرمالین قرار گرفت تا کاملاً فیکس شود. فیکس کردن بافت به منظور جلوگیری از تغییرات بعدی (اتولیز) ضروری است. مرحله آماده‌سازی که عبارت است از:

منظور بررسی مدت زمان تأثیر دوزهای مختلف عصاره، حیوانات باقیمانده گروههای فوق برای تست باروری در کنار حیوانات ماده فعال قرار گرفتند تا زمان عدم تکثیر آنها حیوانات نگهداری و پس از تکثیر از دور آزمایش خارج شدند. در حین آزمایش، حیوانات در روزهای اول، سوم، پنجم، هشتم و دهم آزمایش وزن

جدول ۳- اختلاف میانگین مقادیر عوامل هماتولوژیکی مرحله اول و دوم خونگیری در موشهای صحرایی دریافت‌کننده عصاره گیاه چربش

گروههای آزمایشی				فاکتورهای هماتولوژیک
سوم (۲۵ mg/kg)	دوم (۱۵ mg/kg)	اول (۵ mg/kg)	کنترل	
۳/۵۹	۰/۱۷	۳/۰۷	۳/۷۹	WBC(M/mm ³)
۰/۲۲	۰/۲۵	۰/۲۱	۰/۱۱	RBC(M/mm ³)
۰/۶۲	۱/۲۱	۰/۵۹	۰/۴۲	Hb(g/dl)
۰/۳۲	۰/۵۰	۰/۴۵	۰/۷۲	MCV(fl)
۰/۱۸	۰/۹۱	۱/۵۶*	۰/۸۶	MCH(Pg)
۰/۵۲	۱/۱۷	۲/۳۱	۲/۱۲	MCHC(g/dl)
۰/۹۲	۱/۷۶	۰/۷۷	۰/۲۶	Hct(%)
۲/۲۵	۱۶/۸۴*	۱۰/۲۶	۱۴/۵۰*	Lym(%)

مقادیر جدول مربوط به ۶-۵ موش صحرایی می‌باشد $P < 0.05$.*

جدول ۴- مقادیر هورمون تستوسترون در گروه‌های آزمایش و شاهد موشهای صحرایی دریافت‌کننده عصاره گیاه چربش (در مرحله اول و دوم)

مقادیر تستوسترون گروه‌های آزمایش				زمان بررسی
سوم (۲۵ mg/kg)	دوم (۱۵ mg/kg)	اول (۵ mg/kg)	کنترل	
۰/۶۲±۰/۲۰	۱/۰۵±۰/۱۶	۰/۹۸±۰/۳۱	۱/۶۶±۰/۵۵	مرحله اول
۲/۳۰±۰/۶۸	۰/۹۸±۰/۲۹	۱/۸۱±۰/۳۸	۱/۶۶±۰/۵۴	مرحله دوم

مقادیر جدول $M \pm SD$ در ۶-۵ موش صحرایی، می‌باشند.

انجام شد. $P < 0/05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

الف: تأثیر عصاره گیاه چربش بر فاکتورهای هماتولوژیکی: تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایش بیانگر این است که در روز چهارم آزمایش (مرحله اول خونگیری) مقادیر هموگلوبین و MCH در گروه سوم نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد ($P < 0/05$)

آبگیری با استفاده از اتانول، شفاف‌سازی توسط زایلین^۱، نفوذ و آغشتگی، بافت پس از شفاف‌سازی، به حمام پارافین منتقل می‌شود. در این مرحله زایلین از بافت خارج شده و پارافین جایگزین آن می‌شود. پس از سرد شدن پارافین، بافت به مقاطعی با ضخامت ۷/۱-۶ برش داده شد. رنگ‌آمیزی مقاطع با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین صورت گرفت. لام‌ها پس از آماده‌شدن مورد بررسیهای بافت‌شناسی قرار گرفت. برای محاسبه میانگین و انحراف معیار داده‌های

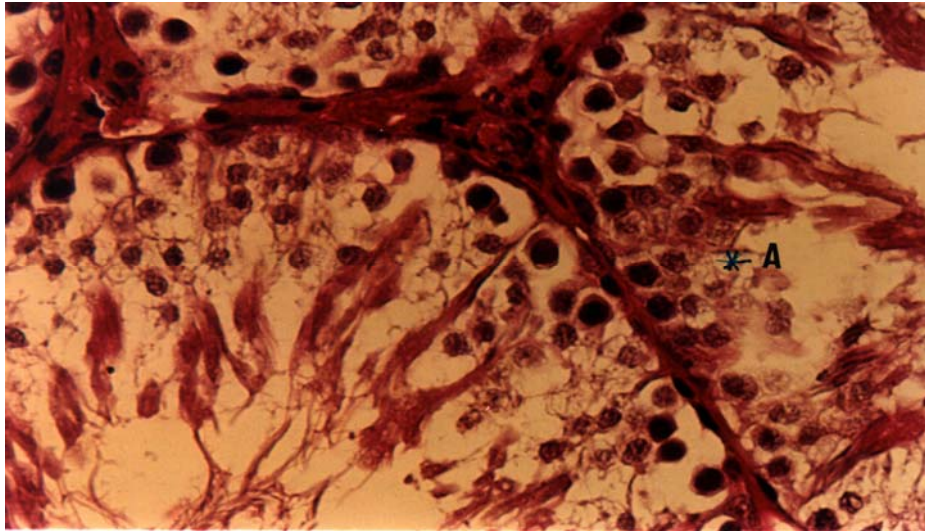
جدول ۵- توزیع وزن موشهای صحرایی در روزهای مختلف در گروه‌های آزمایش و کنترل (بر حسب گرم)

میانگین وزن گروه‌های آزمایش				زمان خونگیری (روز)
سوم (۲۵ mg/kg)	دوم (۱۵ mg/kg)	اول (۵ mg/kg)	کنترل	
۲۰۰/۰۰±۱۰/۲۲	۲۰۰/۸۶±۸/۴۵	۱۷۸/۴۳±۶/۱۹	۱۶۹/۵۰±۹/۰۴	اول
۲۳۰/۶۰±۱۲/۱۳	۱۹۹/۵۷±۱۱/۴۱	۱۹۴/۰۰±۷/۲۳	۱۹۱/۵۰±۸/۴۸	سوم
۲۲۷/۴۰±۱۰/۴۷	۲۰۹/۴۳±۱۱/۹۶	۱۹۰/۲۹±۷/۴۹	۱۸۸/۱۷±۹/۵۳	پنجم
۲۳۷/۰۰±۱۰/۳۲	۱۷۶/۴۳±۱۰/۴۹	۱۹۵/۲۹±۹/۹۷	۱۸۵/۸۳±۷/۹۱	هشتم

مقادیر جدول $M \pm SD$ در ۶-۵ موش صحرایی می‌باشند.

در حالیکه مقادیر سایر فاکتورها در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد (جدول ۱).
بررسی فاکتورهای هماتولوژیک در روز نهم آزمایش (مرحله دوم خونگیری) نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار

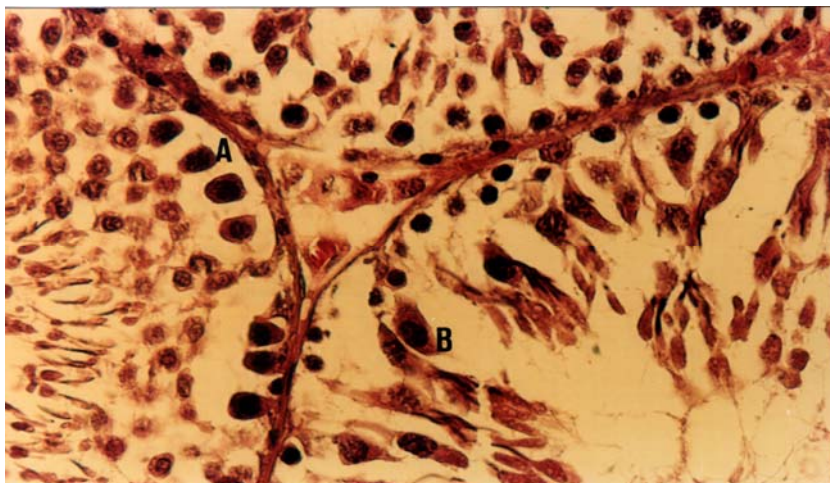
مربوط به گروه‌های آزمایشی از نرم‌افزار آماری SPSS و آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شد. در صورتیکه آزمون فوق بین گروهها تفاوت نشان می‌داد، تجزیه و تحلیل بعدی با استفاده از آزمون Newman-Kevles



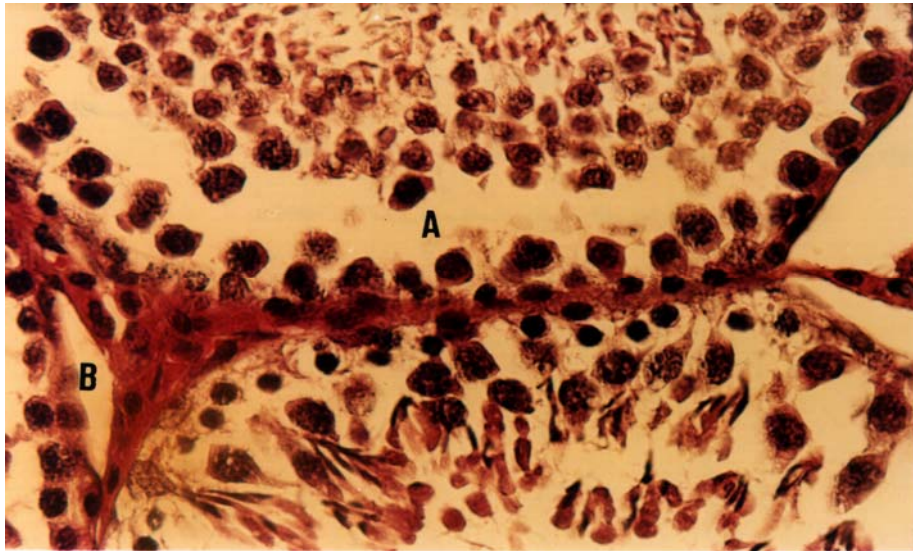
شکل ۱-مقطعی از دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز بیضه موش صحرائی نر دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش (گروه اول آزمایشی)
A: رده‌های مختلف سلولهای اسپرم‌ساز به شکل خوشه‌ای

هموگلوبین، MCH و WBC در گروه سوم نسبت به گروه کنترل است (به ترتیب $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ و $P < 0.05$). مقادیر سایر فاکتورها در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد (جدول ۲). بررسی اختلاف میانگین مقادیر فاکتورهای هماتولوژیک در مراحل اول و دوم خونگیری نشان‌دهنده این است که مقدار MCH در گروه اول و درصد لنفوسیت در گروه کنترل و گروه دوم اختلاف

معنی‌داری نشان می‌دهد ($P < 0.05$) (جدول ۳).
ب-تأثیر عصاره گیاه چریش بر مقدار هورمون تستوسترون: بر اساس مقایسه مقادیر حاصل از اندازه‌گیری مقدار هورمون تستوسترون در گروه‌های مختلف آزمایش در هیچ یک از گروه‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۴).
ج-اثر عصاره گیاه چریش بر وزن: بررسی تغییرات وزنی حیوانات بیانگر این است که در طی مدت آزمایش،



شکل ۲-مقطع دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز در بیضه موشهای صحرائی نر (گروه کنترل)
A: گسست لایه اولیه سلولهای مسئول اسپرماتوژنز (اسپرماتوگونی) از جدار لوله‌ها
B: تورم و دفرمه شدن سلولها



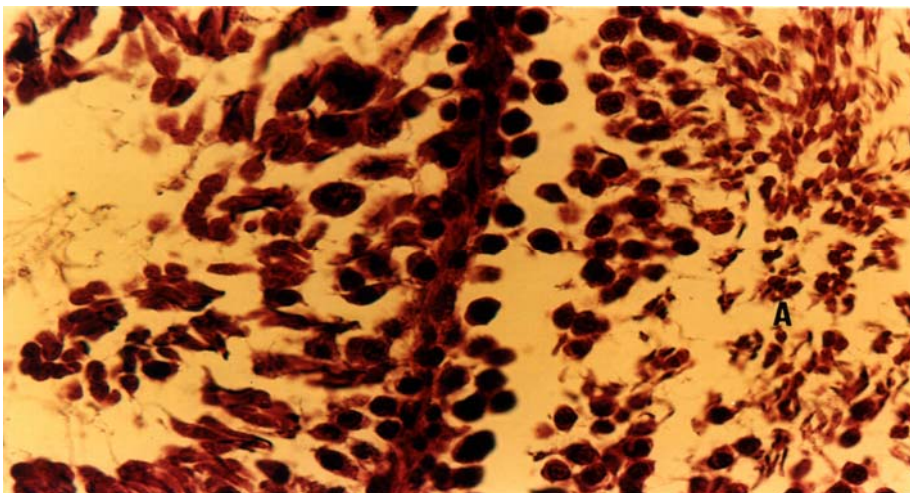
شکل ۳- مقطعی از دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز بیضه موشهای صحرائی دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش (گروه دوم آزمایشی)

A: کاهش رده‌های مختلف سلولهای اسپرم‌ساز

B: پرخونی در بافت بینابینی

سلولهای اسپرم‌ساز و پرخونی در بافت بینابینی در برخی از مجاری^۱ اسپرم‌ساز است که نشان‌دهنده آماس

میانگین وزنی هیچ یک از گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد (جدول ۵).



شکل ۴- مقطعی از دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز در بیضه موشهای صحرائی دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش (گروه آزمایشی سوم)

A: از بین رفتن اسپرمها در مرکز مجرای اسپرم‌ساز

در بافت بینابینی می‌باشد (اشکال ۲ و ۳). همچنین در

د- اثر عصاره گیاه چریش بر بافت بیضه: نتیجه

مطالعات بافت‌شناسی بیانگر کاهش رده‌های مختلف

1-Tubules

برخی مجاری، اسپرمتوزوئیدها در مرکز مجاری اسپرم‌ساز دچار نکروز گردیده‌اند (شکل ۴). گسست لایه اولیه سلولهای مسئول اسپرمتوزنر از جدار لوله‌ها، تورم و تغییر شکل سلولها که بیانگر مرگ سلولی است در برخی مجاری دیده می‌شود (شکل ۲). شکل ۱، مقطعی از دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز بیضه گروه کنترل را نشان می‌دهد که در آن رده‌های مختلف اسپرمتاید بصورت خوشه‌ای و اسپرمتوزوئیدها که سر آنها به سمت محیط و دم آنها به سمت مرکز مشاهده می‌گردد.

مدت زمان تغییر در قدرت باروری و وقفه در تولید مثل این حیوانات در گروه‌های اول، دوم و سوم آزمایشی به ترتیب ۶۰، ۵۰ و ۹۰ روز بود در حالیکه در گروه کنترل پس از ۲۳ روز (دوره بارداری موش‌های صحرایی) تکثیر دیده شد.

بحث

در این مطالعه اثر عصاره گیاه چریش بر فاکتورهای هماتولوژیک، هورمون تستوسترون مورد بررسی قرار گرفت. در حیواناتی که به مدت ۶ روز تحت تیمار با عصاره گیاه چریش بودند، دو مرحله خونگیری در روزهای چهارم و نهم آزمایش انجام و فاکتورهای هماتولوژیک سنجش شد. هموگلوبین و MCH گروه سوم در هر دو مرحله و WBC گروه سوم در مرحله دوم نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۱-۳). در مطالعه انجام شده توسط Parshad و همکاران تجویز دوزهای ۰/۱٪، ۰/۴٪ و ۱/۶٪ عصاره آبی چریش به موشهای صحرایی نر به مدت ۱۰ هفته باعث افزایش معنی‌دار مقادیر RBC، PCV، Hb، MCHC گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنترل شد که این افزایش می‌تواند دلیلی بر وجود برخی ترکیبات فعال در عصاره آبی چریش باشد که تولید سلولهای

خونی را تحریک می‌کند (۹). از طرفی طبق گزارش Talwar و همکارانش در سال ۱۹۹۷ تیمار موشهای صحرایی و میمونهای آزمایشگاهی با عصاره تخلیص شده گیاه چریش تغییر چندانی در فاکتورهای هماتولوژیکی ایجاد نکرد (۱۰). تجویز خوراکی عصاره چریش به موشهای صحرایی نر و ماده به مدت ۹۰ روز هیچ تغییری در مقدار هموگلوبین، RBC، WBC، لوکوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها ایجاد نکرد (۱۱). در مطالعه حاضر مقدار هورمون تستوسترون طی دو مرحله خون‌گیری نیز اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۴). در مطالعه Parshad مقدار هورمون تستوسترون با افزایش دوز عصاره کاهش معنی‌داری نشان داد ($P < 0/01$) که این کاهش را دلیل احتمالی کاهش وزن نسبی سمینال و زیکول‌ها عنوان کرده است (۹). اما مطالعه Krause هیچ اختلاف معنی‌داری را در مقدار هورمون تستوسترون و وزن سمینال و زیکول‌های حیوانات مورد آزمایش نشان نداد (۱۲). اختلاف در نتایج حاصل از آزمایشات مختلف ممکن است ناشی از تفاوت در روش انجام آزمایش از قبیل نوع و دوز عصاره مصرفی، نحوه تجویز عصاره، تکنیک‌های استخراج، طول دوره درمان و گونه حیوانات مورد آزمایش باشد. بررسی‌های بافت شناسی مقاطع تهیه شده از بیضه حیوانات نشان داد عصاره بر مراحل مختلف اسپرمتوزنر در لوله‌های اسپرم‌ساز تأثیر گذاشته و سیر طبیعی اسپرمتوزنر را تغییر می‌دهد. این اختلالات به چندین حالت دیده می‌شود: گسست لایه اولیه سلولهای اسپرمتوگونی از جدار لوله‌ها، تورم و تغییر شکل این سلولها و اسپرمتوسیت‌ها که بیانگر مرگ سلولی است (شکل ۳)، اختلال در تولید اسپرمتایدها، از بین رفتن اسپرمتوزوئیدها در مرکز مجاری اسپرم‌ساز (شکل ۴) و کاهش رده‌های مختلف سلولهای اسپرم‌ساز (اشکال ۲ و ۳). تغییرات فوق در برخی توبولها دیده می‌شود و در کنار آنها توبولهایی

که مراحل اسپرماتوژنز را به طور طبیعی طی می‌کنند نیز وجود دارند. اما از آنجائیکه برای بارور بودن حیوانات نر وجود تعداد معینی اسپرم ضروری است لذا اختلالات ایجاد شده، سبب می‌شود میزان اسپرم لازم جهت باروری تخمک و تشکیل جنین کاهش پیدا کرده و تکثیر در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل با تأخیر همراه باشد. با افزایش دوز عصاره تعداد مجاری که این اختلالات در آنها دیده می‌شود بیشتر شده، مدت زمان وقفه در تولیدمثل حیوانات نیز افزایش خواهد یافت. با گذشت زمان و از بین رفتن تأثیر عصاره، سلولهای آسیب دیده ترمیم یافته و حیوانات قدرت باروری خود را به دست می‌آورند.

طبق بررسیهای انجام شده، عصاره خالص گیاه چریش دارای خاصیت اسپرم کشی قوی بوده، روغن چریش نیز دارای اثرات اسپرم کشی بوده و مانع از لانه‌گزینی می‌گردد (۱۰۵-۱۳). مطالعه اثر عصاره برگهای چریش بر بیضه موشهای صحرائی آلبینو توسط Shaikh، بیانگر ایجاد ضایعه در سلولهای لیدیک و نیز کاهش تعداد و تحرک اسپرم و افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی بود. در مطالعه Shaikh ایجاد تغییراتی از قبیل کاهش وزن، ارتفاع سلولهای اپی‌تلیال، قطر هسته اپی‌تلیال و زیکول سمینال و بخش و نترال^۱ پروستات در اثر تیمار با عصاره برگ چریش شاهدهی غیرمستقیم بر عملکرد آنتی آندروژنی عصاره چریش عنوان می‌شود (۱۶). در مطالعه‌ای دیگر تجویز خوراکی یک عصاره اتانولی خام برگهای چریش به موش‌های نر بالغ به مدت ۶ هفته

باعث افزایش وقوع تغییرات ساختاری و اختلال سیناپتیک در کروموزوم‌های میوزی شده و ضایعات میوزی بیشتری را هم موجب می‌شود. عصاره باعث کاهش تعداد اسپرم و افزایش تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی شد بنابراین احتمال می‌رود که حداقل یکی از اجزای موجود در عصاره گیاه چریش ممکن است با DNA تداخل کرده که نتیجه آن اختلال در تنظیم ژنهای مسئول مرفولوژی اسپرم است (۱۷). با توجه به اینکه در مطالعه فعلی عصاره چریش تاثیر چندانی بر فاکتورهای هماتولوژیک نداشت و مقدار هورمون تستوسترون و وزن حیوانات هم تحت تأثیر عصاره قرار نگرفت و از طرفی عصاره باعث ایجاد کاهش قدرت باروری و وقفه در تولیدمثل حیوانات مورد آزمایش شد چنین به نظر می‌رسد که عصاره این گیاه علاوه بر اثرات ضدباروری خود در میزان فاکتورهای فوق‌الذکر تغییری ایجاد نمی‌کند، بنابراین عصاره گیاه چریش (Neemazal) ماده‌ای ایمن بوده و بدون اینکه عارضه جانبی در اثر مصرف آن ایجاد شود میتوان آنرا برای کنترل باروری در انسان و حیوان مورد استفاده قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای دکتر تقی‌زاده و سرکار خانم ورداسبی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- 1-Singleton G.R., Hinds L.A., Herwig L., et al. Ecologically-based management of rodent pests. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra. 1999.
- 2-Randhawa N.S., Parmar B.S. Neem. Research and Development, Society of Pesticide Science, India. New Dehli Agricultural Research Institue. 1993; pp 283.

- 3-Gogati S.S., Marathe A.D. Anti-viral effect of neem leaf (*Azadirachta indica*) extracts on chinkungunya and measles viruses. J Res Edu Indian Med. 1989; 8: 1-5.
- 4-Singh N., Sastry M.S. Anti-microbial activity of neem oil. Indian J Pharmacol. 1981; 13:102.

1-Ventral

- 5-Kher A., Chaurasia S.C. Anti-fungal activity of essential oils of three medicinals plants. *Indian Drug*. 1997; 15:41- 2.
- 6-Fujiwara T., Takeda T., Ogihara Y., et al. Studies on the structure of polysaccharides from bark of *Melia Azadirachta*. *Chem Pharm Bull*. 1982; 30: 4025- 30.
- 7-Lal R., Sankarnaryanan A., Mathur V.S., et al. Antifertility effect of neem oil in female albino rats by intra vaginal and oral routes. *Indian J Med Res*. 1986; 83: 89- 92.
- 8-Mukherjee S., Garge S., Talwar G.P. Early post implantation contraceptive effects of a purified fraction of neem (*Azadirachta indica*) seeds, given orally in rats: possible mechanisms involved. *Ethnopharmacol*. 1999; 67: 287- 96.
- 9-Parshad O., Singh P., Gardner M., et al. Effect of aqueous neem (*Azadirachta indica*) extract on testosterone and other blood constituents in male rats. *Med J*. 1994; 43: 71- 4.
- 10-Talwar G.P., Shah S., Mukherjee S., et al. Induced termination of pregnancy by purified extracts of *Azadirachta indica* (neem): mechanisms involved. *Am J Reprod Immunol*. 1997; 37: 485- 91.
- 11-Raizada R.B., Srivastava M.K., Kaushal R.A., et al. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food Chem Toxicol*. 2001; 39: 477- 83.
- 12-Krause W., Adami M. Extracts of neem (*Azadirachta indica*) seed kernels do not inhibit spermatogenesis in the rat. In: *Proc 2nd Intl Neem Conf Rauschholzhausen Fed Rep Germany*. 1983; 483- 789.
- 13-Garge S., Doncel G., Chabra S., et al. Synergistic spermicidal activity of neem seed extract, reetha saponins and quinine hydrochloride. *Contraception*. 1994; 50: 185- 90.
- 14-Sander F.V., Cramer S. D. A practical method of testing the spermicidal action of chemical contraceptives. *Hum Fertil*. 1941; 6: 134.
- 15-Sinha K.C., Riar S.S., Tiwary R.S., et al. Neem oil as a vaginal contraceptive. *Indian J Med Res*. 1984; 79:131- 6.
- 16-Shaikh P.D. Studies on the antifertility effect of *Azadirachta indica* leaves on the testis of albino rats. M Phil Dissertation. Karnataka University, Dharwad, India. 1990.
- 17-Awasthy K.S. Genotoxicity of a crude leaf extract of neem in male germ cells of mice. *Cytobios*. 2001; 106: 151- 64.