ORIGINAL ARTICLE

Antifertility Effect of Ruta graveolens Aqueous Extract in Female Mice

Aref Hoshyari[1],
Golamreza Najafi[2],
Rajabali Sadrkhanlo[3],
Leila Roshangar[4]

[1] DVSc Student, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[3] Professor, Department of Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
[4] Professor, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran

(Received February 2, 2014 ; Accepted September 6, 2014)

Abstract

Background and purpose: *Ruta Graveolens* (RG) commonly called sudab, has been known as a medicinal plant since ancient times. Anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-tumor, anti-androgenic, and anti-fertility activities are amongst the medicinal properties of RG. The present study investigated the antifertility effects of RG and in-vitro embryo development in female mice.

Materials and methods: The study was performed in 30 female mice that were divided into two groups as control and RG. The control group received normal saline 0.2 ml and the RG group received 300 mg/kg aqueous extract of RG per day, orally for 14 days. Matured oocytes were transported to HTF+BSA (4mg/ml). Then fertilized oocytes, two cell, blastocyst and hatching embryos were evaluated.

Results: In case group RG reduced embryo growth ($P<0.05$) at different stages. However, by disrupting RG administration no significant differences were observed between control and test animals.

Conclusion: The results showed that the aqueous extract of RG decreased the embryo growth and fertilizing ability in female mice. Moreover, the negative impact of RG on fertilizing potential is recurrentable after disruption of exposure.

Keywords: Anti-fertility, Rutagraveolens, Mice

J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 24(117): 133-142 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۷ مهر سال ۱۳۹۳ (۱۴۲-۱۳۳)

ارزیابی اثر ضد باروری عصاره آبی سداب در موش ماده

عارف هوشیاری[۱]
غلامرضا نجفی[۲]
رجبعلی صدرخانلو[۳]
لیلا روشنگر[۴]

چکیده

سابقه و هدف: وتاگراوئولنس (RG) به طور معمول تحت عنوان سداب، از زمان قدیم به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است. فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد التهاب، ضد تومور و ضد آندروژن از جمله خواص دارویی RG است. این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات ضد باروری عصاره آبی سداب و میزان رشد داخل آزمایشگاهی جنین ها در موش ماده صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، ۳۰ موش ماده استفاده شد. حیوانات به ۲ گروه کنترل و RG تقسیم شدند. گروه‌های کنترل ۰/۲ میلی لیتر نرمال سالین و گروه‌های RG عصاره آبی RG را با دوز ۳۰۰ mg/kg در هر روز به صورت خوراکی به مدت ۱۴ روز دریافت کردند. اووسیت‌های بالغ به محیط کشت HTF حاوی BSA (۴ mg/ml) انتقال داده شدند. درصد اووسیت‌های لقاح یافته، جنین‌های دو سلولی، بلاستوسیست‌ها و جنین‌های هچ شده پارامترهای مورد ارزیابی در این مطالعه بودند.

یافته‌ها: RG در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) در رشد جنین‌ها در مراحل مختلف شد. این در حالی است که با توقف مصرف عصاره، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و آزمایشی مشاهده نشد.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف عصاره آبی RG با کاهش رشد جنین‌ها، توان باروری را در موش‌های ماده کاهش می‌دهد. مضافاً اینکه اثرات منفی سداب بر باروری با قطع مصرف برگشت‌پذیر می‌باشد.

واژه های کلیدی: ضد باروری، روتاگراوئولنس، موش

مقدمه

خانواده روتاسه آ (Rutaceae) شامل تعداد زیادی از گیاهان معطر می باشد که دارای ۱۵۰ جنس و ۱۵۰۰ گونه است. جنس روتا (Ruta) یکی از مهم‌ترین و ارزشمندترین جنس‌های این خانواده است(۱).گونه روتاگراوئولنس (Rutagraveolens) (RG) درمناطق مختلف جهان کشت شده و به اسامی مختلفی شناخته می‌شود. سداب (Sodab) یا ساداب (Sadab) از معروف‌ترین اسامی این گیاه می‌باشد. این گیاه یک گل تزئینی و با بوته همیشه سبز با بیش از یک متر ارتفاع است. گیاهی چند ساله بوده و برگ‌های آن به رنگ سبز با گل‌های زرد رنگ و میوه آن از نوع کپسول با بوی ناخوشایند است. بیش از ۱۲۰ ترکیب طبیعی از قبیل

مولف مسئول: غلامرضا نجفی– ارومیه: دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی E-mail: g.najafi2006@yahoo.com
۱. دانشجوی دکتری تخصصی علوم تشریح، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. استادیار، گروه آناتومی- بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استاد، گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. استاد، گروه بافت شناسی و جنین شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۲/۱۱/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۳/۱/۲۰ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۶/۱۵

آکریدون آلکالوئیدها (Acridone alkaloids)، کومارین‌ها (Coumarins)، اسیدهای چرب (مثل پالمتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید و لینولئیک اسید)، فلاونوئیدها (Flavonoids) و فوروگوئنولین‌ها (Furoquinolones) در ریشه و بخش‌های هوایی سداب یافت می‌شود(۴-۲). این گیاه منبع مهم و اصلی فورانوکومارین‌ها (Furanocoumarins) از قبیل سورالن (Psoralens)، گزانتوتوکسین (Xanthotoxin) و برگاپتن (Bergapten) است(۵).

تحقیقات گسترده‌ای که بر روی خواص دارویی این گیاه در مناطق مختلف دنیا انجام گرفته است، نشان می‌دهد که این گیاه در جوامع مختلف کاربرد دارویی دارد. مهم‌ترین خواص دارویی ذکر شده برای گیاه سداب شامل فعالیت آنتی اکسیدانت، ضدالتهاب، سیتوتوکسیک، آنتی تومور، آنتی آریتمیک، آنتی‌آندروژنیک، ضد بارداری و باروری می‌باشد. این خواص گسترده به دلیل تنوع مواد موثره موجود در این گیاه می‌باشد(۶).

به دلیل تنوع زیاد مواد موجود در این گیاه، با وجود داشتن خواص دارویی، مانند بسیاری از داروها، مصرف آن در برخی موارد از قبیل افراد آبستن(۸،۷) شیرده، کودکان، افراد سالخورده، بیماران کلیوی و قلبی منع شده است. به عنوان مثال سداب به علت داشتن مواد مؤثره سیتوتوکسیک، برای جنین سمی بوده و میتواند باعث اختلال در لانه گزینی و سقط جنین شود(۱۲-۹).

در طب سنتی، سداب برای اهداف متفاوتی استفاده می‌شود. از سداب برای پیش انداختن قاعدگی، کنترل فشارخون، درمان هیجان، تسکین علایم سردرد و درد گوش، ضد عفونی پوست، دورکننده حشرات، دردهای روماتیسم، به عنوان آنتی‌اکسیدانت و کاهنده مقادیر تری اسیل گلیسرول استفاده شده است. همچنین مواد موثره سداب دارای خواص ضد قارچی است که می‌تواند در پزشکی و کشاورزی مفید باشد. فلاونوئید موجود در سداب دارای فعالیت ضد باکتریایی است(۷،۱۱، ۱۵-۱۳).

یکی از کاربردهای سنتی سداب،کاهش فعالیت اسپرم جهت جلوگیری از باروری در مردان و سقط جنین و ضد بارداری در زنان است. عرضه این داروی گیاهی عمدتاً به شکل سنتی است. در اغلب موارد فروشندگان و مصرف‌کنندگان اطلاعات کافی در خصوص عوارض جانبی، دوز مصرفی، شکل مصرف، شرایط جسمی و سلامتی مصرف‌کننده ندارند.

تحقیقات بر روی اثرات ضدباروری سداب در حیوان نر به صورت وسیع انجام گرفته است. ولی تحقیقات انجام یافته بر روی حیوان ماده اندک بوده است. هر چند که نصیرزاده و همکاران آثار منفی عصاره بر انواع فولیکول‌های تخمدانی را گزارش کرده اند، ولی هیچ‌گونه مطالعه که سرنوشت و کیفیت این فولیکول‌ها و قدرت لقاح و رشد جنین‌های حاصل را بررسی نماید، وجود نداشت(۲۷). لذا در تحقیق حاضر سرنوشت فولیکول‌های متاثر از عصاره سداب، توسط پروسه لقاح آزمایشگاهی پیگیری گردید تا بتوان در خصوص اثرات ضد باروری عصاره سداب بر روی حیوان ماده، قضاوت دقیق‌تری کرد. به علاوه در تحقیق حاضربا بررسی اثرات سداب در فازهای زمانی مشخص (متعاقب تجویز و قطع تجویز دارو) سعی گردید اثرات دائمی و موقت سداب نیز مورد ارزیابی قرار گیرد تا از این طریق بتوان در خصوص امکان و زمان بازگشت توان باروری حیوان در سیکل‌های جنسی بعدی، متعاقب قطع مصرف آن، قضاوت نمود.

مواد و روش‌ها

۱. طرز تهیه عصاره آبی سداب

گیاه سداب از یکی از فروشگاه‌های داروهای گیاهی شهرستان ارومیه تهیه گردید و توسط اساتید محترم دانشکده کشاورزی مورد شناسایی قرار گرفت. سپس در یک اتاق تاریک با دمای ۲۵ الی ۳۰ درجه خشک شده و توسط آسیاب برقی خرد گردید. در ظرف‌های جداگانه مقدار ۱۰۰ گرم از پودر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالین حل و در دمای اتاق روی دستگاه شیکر به

مدت ۷۲ ساعت قرار دادهشد.سپس محلول موجود چند بار از صافی عبور داده شد و بعد از آن مایع به دست آمده در RPM ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری و در دمای اتاق تبخیر گردید. عصاره (به رنگ قهوه ای تیره) به دست آمده در ظرف دربسته‌ای قرار داده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد(۱۷،۱۶).

۲. حیوانات مورد آزمایش

حیوانات مورد آزمایش در این مطالعه از بخش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی ارومیه تهیه گردید. تمام موش‌ها در شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در اتاقی با دمای ۲۰ الی ۲۵ درجه سانتی‌گراد با دسترسی آزاد به مواد غذایی وآب نگهداری شدند. موش‌های ماده مورد استفاده در شروع آزمایش در سن ۶ هفتگی بودند.

۳. گروه بندی حیوانات

در این تحقیق تعداد ۳۰ موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده نابالغ در دو گروه کنترل و RG به صورت تصادفی تقسیم شدند. گروهای کنترل وRG هر کدام به سه گروه (کنترل هفته اول، کنترل هفته دوم، کنترل هفته سوم و RG هفته اول، RG هفته دوم وRG هفته سوم) تقسیم شدند.

به گروه‌های کنترل روزانه ۰/۲ میلی‌لیتر نرمال سالین به صورت خوراکی از طریق گاواژ وبرای گروه‌هایRG روزانه ۳۰۰mg/kg (۲۷) عصاره در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر به صورت خوراکی از طریق گاواژ به مدت دو هفته خورانده شد.

نمونه‌برداری از موش‌ها در هفته اول، هفته دوم و هفته سوم بعد از اتمام تجویز عصاره صورت گرفت. قبل از نمونه برداری، در تمام گروه‌ها، به هر موش ماده ۱۰ واحد بین‌اللملی گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (Pregnant serum gonadotropin), PMSG)) از طریق داخل صفاقی تزریق گردید. جهت استحصال اووسیت‌های نابالغ، ۴۸ ساعت بعد از تزریق هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبستن، موش‌ها توسط جابه‌جایی مهره‌های گردنی آسان کشی شده و اووسیت‌های نابالغ از تخمدان اخذ شدند(۱۹،۱۸). در هنگام انجام آزمایشات بر روی حیوانات تمامی اصول و موازین اخلاقی و کار با حیوانات رعایت گردید.

۴. جمع‌آوری اووسیت‌های نابالغ

جمع‌آوری اووسیت‌ها در هفته اول، هفته دوم و هفته سوم بعد از اتمام تجویز عصاره، صورت گرفت. محیط‌های کشت αMEM و HTF، ۱۲ ساعت قبل از شروع کار، در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرار داده شدند. تخمدان‌ها بعد از برداشتن از موش‌ها، جهت شستشو به داخل محیط کشت αMEM انتقال داده شدو۲ الی ۳ بار شستشو شدند تا خون موجود از روی تخمدان برداشته شود. متعاقب آن در زیر استرومیکروسکوپ توسط سر سوزن گیج ۲۸ فولیکول‌های تخمدان پانچ شدند تا اووسیت‌های نابالغ به داخل محیط کشت آزاد شوند. سپس اووسیت‌های نابالغ به وسیله پیپت دهانی به داخل قطرات محیط کشت αMEM در زیرروغن معدنی، انتقال داده شدند(۲۰،۱۸).

۵. بلوغ آزمایشگاهی (IVM) اووسیت‌های نابالغ

اووسیت‌های نابالغ در داخل قطرات محیط کشت MEM α حاوی ۰/۱ واحد در هر سی سی هورمون FSH (follicle stimulating hormone) و ۰/۵ واحد در هر سی سی hCG (human chorionic gonadotropin) و ۵ درصد سرم جنین گاو(Bovine Serum Albumin) FBS و استرپتومایسین ۱۰ میکروگرم در هر سی سی، پنی سیلین ۷۵ میکروگرم در هر سی سی و سدیم پیرووات ۰/۲۳ میلی مولکه توسط روغن معدنی پوشیده شده است قرار داده شدند. سپس در داخل انکوباتور با

دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۱۶ الی ۱۸ ساعت انکوبه شدند.

اووسیت‌ها بعد از این مدت بررسی شده و آن‌هایی که دارای جسم قطبی (polar body) بودند، جهت انجام لقاح آزمایشگاهی انتخاب شدند(۱۸،۲۰).

۶. آماده سازی اسپرم

موش‌های نر ۸ الی ۱۰ هفته‌ای جهت گرفتن اسپرم انتخاب شدند. بعد از آسان‌کشی موش‌ها توسط جابه‌جایی مهره‌های گردنی، محوطه شکمی آن‌ها را باز کردهو بعد از دسترسی به بیضه‌ها، دم اپیدیدیم جدا گردید. بعد از ایجاد چند برش، داخل محیط کشت HTF حاوی ۴ میلی‌گرم BSA در هر سی سی در داخل میکروتوبول استریل قرارداده شدند. جهت شناورشدن اسپرم‌های زنده و جهت ظرفیت‌یابی در داخل انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن)به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شدند. توسط میکروسکوپ نوری در روی لام هموسیتومتر تحرک و تعداد اسپرم‌ها بررسی شدند. ازنمونه‌های اسپرم (با تحرک بالای ۸۰ درصد)، با توجه به تعداد آن‌ها، حجمی حاوی یک میلیون اسپرم به ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت، به قطرات محیط کشت اضافه گردید(۲۱).

۷. ارزیابی میزان لقاح آزمایشگاهی

اووسیت‌های بالغ حاصل از پروسه IVM دوبار در محیط کشتHTF شستشو داده شد. سپس به قطرات اصلی لقاح ۵۰۰ میکرولیتری منتقل شدند. اسپرم‌های ظرفیت‌یابی شده به تعداد تقریبی 1×10^{6} به قطرات لقاح حاوی اووسیت افزوده شدو در داخل انکوباتور (دمای $37^{\circ}C$ و ۵ درصد دی اکسید کربن) قرار داده شدند. بعد از ۴ الی ۶ ساعت با مشاهده پیش هسته‌های نر و ماده درصد لقاح به دست آمد. اووسیت‌ها لقاح یافته ۲ الی ۳ بار در قطرات جدید محیط کشت شستشو داده شده و به داخل قطرات کشت منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت درصد جنین‌های دو سلولی و در روز ۴ جنین‌های مرحله بلاستوسیست و در روز ۵ میزان هچ شدن بلاستوسیست‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند(۲۰،۱۸).

آنالیز آماری:

جهت انجام مطالعات آماری از برنامه SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. داده‌های به دست آمده توسط تست‌های ANOVA و دانکن مورد تحلیل و تجزیه آماری قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار (Mean ± SEM) نشان داده شد و $p<0/05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج به دست آمده در مراحل مختلف ارزیابی در جدول شماره ۱ آورده شده و به تفکیک به شرح ذیل می‌باشد:

۱. ارزیابی تخمک‌های بالغ (اووسیت‌های متافاز II):

در این مطالعه مشخص گردید که میانگین تعداد تخمک‌های بالغ به دست آمده از پروسه IVM، در موش‌های گروه‌های RG در هفته اول و دوم بعد از قطع مصرف عصاره کاهش معنی‌داری ($p<0/05$) نسبت به گروه‌های کنترل داشته است. ولی در هفته سوم بعد از قطع مصرف عصاره، هرچند کاهش در میانگین تعداد اووسیت‌های بالغ وجود داشته ولی این کاهش معنی‌دار نبود.

همچنین میانگین تخمک‌های بالغ در هفته اول و دوم بعد از قطع مصرف عصاره، تفاوت معنی‌دار نداشته، ولی در هفته سوم افزایش معنی‌داری ($p<0/05$) در میانگین تخمک‌های بالغ نسبت به هفته اول و دو موجود داشت (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱).

۲. میانگین درصد لقاح:

میانگین درصد لقاح در بین گروه‌های کنترل و RG هفته سوم تفاوت معنی‌داری با هم نداشته ولی در بین گروه‌های کنترل وRG هفته اول و دوم تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) در میانگین درصد لقاح وجود دارد. ضمن این‌که در گروه RG هفته سوم تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) با هفته اول و دوموجود دارد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱).

۳. میانگین درصد جنین های دو سلولی:

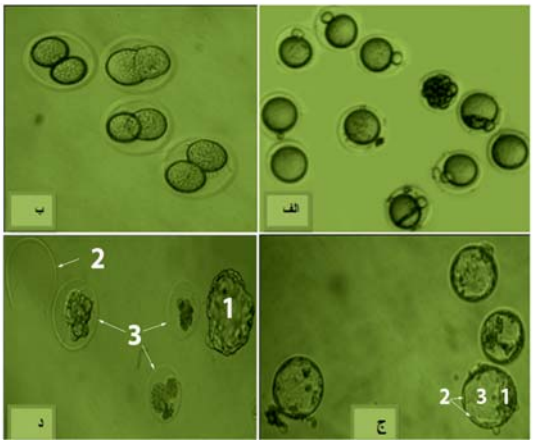
نتایج این مطالعه نشان داد که درصد جنین های دو سلولی در گروه‌های RG هفته اول و دوم کاهش یافته و اختلاف معنی‌داری (p<۰/۰۵) با گروه‌های کنترل دارد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱).

۴. میانگین درصد جنین‌های مرحله بلاستوسیست

بررسی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که درصد جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست رسیده‌اند، در گروه‌های کنترل وRG هفته سوم تفاوت معنی‌داری ندارند اما بین گروه‌های RG و کنترل در هفته اول و دوم تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) وجود دارد. همچنین بین گروه هفته سوم و هفته‌های اول و دوم نیز تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۵) در درصد جنین‌های مرحله بلاستوسیست وجود دارد (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱).

۵. میانگین درصد جنین‌های هچ شده:

نتایج نشان می‌دهد که در گروه‌های RG، درصد جنین‌های هچ شده نسبت به گروه‌های کنترل کمتر بود که این تفاوت در بین گروه‌های کنترل و RG هفته‌های اول و دوم معنی‌دار (p<۰/۰۵) ولی با RG هفته سوم معنی‌دار نیست. درصد هچ شدن جنین‌ها بین گروه‌های RG هفته‌های اول و دوم با RG هفته سوم تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بود (جدول شماره ۱ و تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الف- گروه کنترل: تعدادی تخمک بالغ بعد از انجام بلوغ آزمایشگاهی که دارای یک گویچه قطبی هستند. ب- گروه کنترل: ۲۴ بعد از لقاح تعدادی جنین در مرحله دو سلولی ج- در روز ۴ بعد از لقاح، جنین ها در مرحله بلاستوسیست دیده می شوند که در این بلاستوسیست ها توده سلولی داخلی (۱)، سلوهای تروفوبلاست (۲) و حفره بلاستوسل (۳) دیده می شود. د- در گروه RG1 (سداب هفته اول) یک جنین هچ شده (۱) و پرده شفاف (۲) متعلق به آن و تعدادی جنین متوقف شده (۳) دیده می شود.

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تعداد تخمک های بالغ، درصد لقاح، درصد جنین های دوسلولی، درصد بلاستوسیست و درصد هچ شدن جنین ها در گروه های کنترل و RG

گروه	میانگین تخمک متافاز II	درصد لقاح	درصد جنین های دو سلولی	درصد بلاستوسیست	درصد هچ شدن جنین ها
کنترل هفته اول	^{a}۳۲/۴±۴/۸۷	^{a}۶/۴۲±۹۰/۱۳	^{a}۴/۲۵±۹۱/۳۱	^{a}۸/۲۸±۷۸/۰۵	^{a}۱۳/۰۸±۶۳/۲۵
RG- هفته اول	^{b}۹/۸±۲/۷۷	^{b}۸/۰۹±۵۰/۶۳	^{b}۱۳/۷۴±۵۸/۳۳	^{b}۲/۶۸±۳۲/۱۶	^{b}۸/۷۴±۲۲/۷۰
کنترل هفته دوم	^{a}۳۳/۶±۳/۵۰	^{a}۲/۶۲±۹۰/۰۷	^{a}۳/۸۱±۹۱/۲۹	^{a}۷/۱۳±۷۹/۲۴	^{a}۸/۰۶±۶۶
RG هفته دوم	^{b}۱۳±۳/۸۷	^{b}۷/۴۴±۶۲/۱۳	^{b}۷/۶۶±۶۷/۱۲	^{b}۱۲/۱۷±۴۰/۱۸	^{b}۸/۱۱±۱۹/۹۷
کنترل هفته سوم	^{a}۳۳/۲±۳/۲۷	^{a}۴/۸۴±۸۹/۲۸	^{a}۶/۴۲±۸۸/۰۸	^{a}۷/۳۶±۷۷/۸۸	^{a}۹/۰۸±۶۳/۶۴
RG هفته سوم	^{ac}۲۳/۴±۴/۰۹	^{ac}۵/۸۲±۷۸/۷۸	^{ab}۳/۷۹±۷۶/۲۲	^{ac}۹/۸۵±۶۱/۲۸	^{ac}۱۱/۷۱±۴۷/۲۶

^{a}نشان دهنده اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) با ^{b} در هر ستون می باشد.

^{ac} نشان دهنده اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) با ^{b} و عدم اختلاف معنی دار با ^{a} در هر ستون می باشد.

^{ab}نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) با^{a} و ^{b} در هر ستون می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر، متعاقب استفاده خوراکی از عصاره آبی سداب در موش‌های ماده نابالغ به مدت دو هفته، مشخص گردید اووسیت‌های حاصل از این موش‌ها در پروسه لقاح آزمایشگاهی نسبت به گروه

کنترل لقاح ضعیف‌تری دارند و جنین‌های حاصل از این اووسیت‌ها نسبت به گروه کنترل پیشرفت کمتری دارند و زمانی که مصرف عصاره قطع می‌شود، در سیکل‌های بعدی با شروع رشد فولیکول‌های اولیه مجدداً باروری بهبود می‌یابد.

میزان موفقیت در پروسه لقاح آزمایشگاهی (IVF) و رشد جنین‌ها به فاکتورهای زیادی وابسته است. عوامل مربوط به کیفیت اسپرم، تخمک و همچنین عوامل محیطی، در دوره انجام IVF از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در رشد و تکامل جنین هستند(۲۲).

تحقیقات نشان میدهد که فلاونوئیدها (Flavonoids)، روتین (Rutin)،گوئرستین (Quercetin) و فورانوکومارین‌ها (Furanocoumarins) بیش‌ترین ترکیبات شیمیایی موجود در گیاه سداب هستند. روتین و گوئرستین در بین آن‌ها از اهمیت زیادی برخوردار هستند چرا که این دو ترکیب دارای خواص مهمی از جمله ضد التهاب و ضد اکسیداتیو هستند. گوئرستین دارای فعالیت ضد تکثیر بوده و پروآپوپتوز است. تکامل فولیکول‌ها شدیداً وابسته به پروسه‌های آنژیوژنز است که گوئرستین اثر مهاری بر تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های آندوتلیال در آنژیوژنز دارد. لذا گوئرستین می‌تواند اثرات منفی روی تخمدان داشته باشد(۲۳) و از طرفی فلاونوئیدها دارای اثرات هپاتوتوکسیک و سیتوتوکسیک نیز هستند و می‌توانند با برخی از پروتئین‌های انتقال دهنده هورمون بر همکنش نشان داده و همچنین برخی از آنزیم‌ها را غیرفعال کند و این باعث تغییر غلظت بافتی هورمون‌ها از قبیل استروئیدها و پروستاگلندین‌ها می‌شود(۶).

نابیل و همکاران در مطالعه برروی عصاره سداب با دوز ۵۰۰mg/kgو رحیم و همکاران با دوز ۲۰mg/kgدر موش‌های نر نشان دادند که این عصاره به صورت مستقیم یا غیرمستقیم می‌تواند برفعالیت ترشحی غده هیپوفیز اثر کند و در نتیجه هورمون‌های کنترل‌کننده اسپرماتوژنز را تغییر دهد. همچنین مشخص شده است که پروسه اسپرماتوژنز و فعالیت ارگان‌های فرعی تولید مثل وابسته به آندروژن است. بنابراین تغییر در تولید آندروژن‌ها می‌تواند باعث کاهش تعداد سلول‌های لیدیک بالغ و کاهش کارآیی آن‌ها شود(۲۵،۲۴).

عصاره سداب باعث کاهش مقادیر سرمی آندروژن میشود. این نتایج نشان می‌دهد که استفاده از سداب در رت‌های بالغ نر باعث کاهش باروری میشود و درموش‌های ماده که با موش‌های نر استفاده کننده از سداب جفت‌گیری میکنند، میزان آبستنی کاهش می‌یابد. به علاوه تعداد لانه‌گزینی و جنین‌های زنده کاهش می‌یابد. این کاهش می‌تواند ناشی از کاهش حرکت و تراکم اسپرم باشد که ممکن است ناشی از اثر سداب بر روی آنزیم‌ها شامل پروسه فسفوریلاسیون اکسیداتیو باشد(۲۵،۲۴). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که در موش‌های ماده دریافت‌کننده سداب، درصد باروری کاهش یافته است.همچنین بر روی روند رشد و تکامل جنین‌ها اثر منفی گذاشته است. به طوری‌که باعث کاهش درصد جنین‌های دو سلولی، بلاستوسیست‌ها و هچ شدن جنین‌ها شده است.

سداب می‌تواند ماهیچه‌های رحم را تحریک و باعث شروع قاعدگی شود و این امر ممکن است منجر به کاهش باروری و توقف لانه‌گزینی تخم‌های لقاح یافته شود(۲۶).

در تحقیقی که توسط نصیرزادهو همکاران انجام گرفته است،عصاره آبی سداب با دوز ۳۱۰ mg/kg در موش ماده به روش داخل صفاقی باعث تغییر در مورفولوژی تخمدان و هورمون‌های جنسی در موش‌های ماده گردیده بود. آن‌ها گزارش کردند که تعداد فولیکولهای مقدماتی، وزن تخمدان و جسم زرد کاهش می‌یابد و همچنین تعداد فولیکول‌های آترتیک افزایش یافته و مقادیر استروژن کاهش می‌یابد.آنان بر اساس یافته‌های خود اعلام کردند که عصاره سداب می‌تواند به عنوان ماده ضد بارداری مطرح شود(۲۶).

علاوه برآن در شستشوی از طریق اویدکت متعاقب

جفتگیری و استفاده از عصاره سداب مشاهده گردید که تعداد جنین‌های غیر طبیعی و مرگ جنین‌ها افزایش می‌یابد(۲۷).

رشد و تکامل فولیکول ها دراثر تکثیر سلول‌های گرانولوزا و تحت کنترل هورمون‌های محور هیپوفیز- اپی‌تالاموس- تخمدان می‌باشد. سلول‌های گرانولوزا نقش تغذیه رسانی به اووسیت را بر عهده دارند و هرگونه نارسایی و نقص در تکثیر و ساختار این سلول‌ها، در نهایت باعث آسیب به تخمک و کاهش شانس ادامه رشد آن بعد از لقاح می‌شود. رشد غیر طبیعی و نقایص تخمک باعث افزایش پلی‌اسپرمی و لقاح غیرطبیعی و همچنین تقسیم غیرطبیعی جنین می‌شود. هر عاملی که با اثر در تخمدان بتواند رشد طبیعی فولیکول را با اختلال مواجه سازد، با اثر بررشد جنین‌ها، باعث کاهش میزان موفقیت در پروسه IVF می‌شود(۲۲). در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید که عصاره سداب باعث کاهش تعداد اووسیت‌های بالغ در موش می‌شود.

در بین عوامل موثر در پیشرفت و تکامل جنین، کیفیت اووسیت‌ها نقش کلیدی دارند. چون جنین علاوه بردریافت نصفی از ماده وراثتی، تقریباً کل سیتوپلاسم خود را از اووسیت می‌گیرد. به نظر می‌رسد مواد مؤثر سداب مثل گوئرستین و فلاونوئیدها با ممانعت از تکثیر طبیعی سلول‌های گرانولوزا و آسیب به ارگانل‌های داخل سلولی مثل میتوکندری، باعث اختلال در تغذیه اووسیت‌ها واختلال در تقسیم سلولی می‌شود. این عوامل به نوبه خود توانسته‌اند تعدادااووسیت‌های بالغ، درصد لقاح، بلاستوسیست‌ها و هچ را به طور چشمگیری در گروه RGکاهش دهند؛ که با قطع مصرف عصاره اثرات منفی کم شده و سلول‌ها در حال تکثیر مثل فولیکول‌ها در سیکل‌های جنسی بعدی به رشد طبیعی خود ادامه می‌دهند. به نظر می‌رسد اثرات منفی سداب بر روی تخمدان و فولیکول‌ها موقتی بوده و بعد از قطع دارو،بعد از یک دوره بهبودی بسته به نوع گونه حیوانی و طول سیکل جنسی باید منتظررشد طبیعی اووسیت‌ها و بهبود باروری بود. با توجه به اینکه متعاقب ۳ هفته از قطع تجویز عصاره سداب، تفاوت معنی‌داری در نتایج رشد جنینی بین گروه کنترل و RG مشاهده نگردید، می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که سداب بر بانک فولیکولی (فولیکول‌های مقدماتی و اولیه) تاثیر منفی نداشته یا اثر کمتر داشته است. این مساله می‌تواند به دلیل متابولیسم و فعالیت کم‌تر این نوع از فولیکول‌ها اتفاق افتاده باشد. بنابراین در مواردی که از عصاره سداب برای اهداف جلوگیری از باروری و یا سایر مقاصد مطرح شده استفاده می‌شود؛ دوره زمانی، دز مصرفی و علت تجویز برای مصرف‌کننده می‌بایستی مورد توجه قرار گیرد. مضافاً این‌که سداب با ایجاد اختلال در رشد جنینی می‌تواند توان باروری را در زنان کاهش دهد. در ضمن، مشاهدات مطالعه حاضر نشان داد اثرات سداب در طی مواجهه پایدار می‌باشد ولی در صورت قطع تجویز اثرات منفی آن بر توان باروری بهبود پذیر می‌باشد.

بررسی تغییرات ساختمانی اووسیت و فولیکول‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی و همچنین بررسی ژن‌های آپوپتوز و گیرنده‌های هورمون‌های جنسی می‌تواند جهت یافتن مکانیسم اثراین عصاره کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری

این تحقیق قسمتی از پایان نامه دکتری تخصصی علوم تشریح دامپزشکی بوده که هزینه‌های آن از محل اعتبار پایان‌نامه تأمین شده است. از مسئول آزمایشگاه جنین شناسی و بافت‌شناسی دانشکده دامپزشکی، آقای علی کریمی به خاطر هماهنگی و کمک به عملیات آزمایشگاهی تحقیق حاضر تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Fredj MBH, Marzouk B, Chraief I, Boukef K, Marzouk Z. Analysis of Tunisian Ruta

graveolens L. oils from Jemmel. J Food Agric Environ 2007; 5(1): 52-55.
2. Kuzovkina I, Alterman I, Schneider B. Specific accumulation and revised structures of acridone alkaloid glucosides in the tips of transformed roots of Rutagraveolens. Phytochemistry 2004; 65(8): 1095-1100.
3. Kirtikar KR, Basu BD. Indian Medicinal Plants with Illustrations. 2th ed. Uttaranchal: Oriental Enterprises; 2003.
4. Nadkarni KM. Indian Plants and Drugs. 5thed. New Delhi: Srishti Book Distributers; 2005.
5. Milesi B, Massot B, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A. Ruta graveolens L.: a promising species for the production of furanocoumarins. Plant Sci 2001; 161(6): 189-199.
6. Shabir AP, Jalal UB, Ghufran A, Najeeb J, Sofi G, Faisal Iqbal SM. Ruta graveolens: from Traditional System of Medicine to Modern Pharmacology: an Overview. Am J Pharm Tech Res 2012; 2(2): 239-252.
7. Hale AL, Meepagala KM, Oliva A, Aliotta G, Duke SO. Phytotoxins from the leaves of Rutagraveolens. J Agric Food Chem 2004; 52(11): 3345-3349.
8. Ciganda C, Laborde A. Herbal infusions used for induced abortion. J Toxicol Clin Toxicol 2003; 41(3): 235-239.
9. Chávez M, Franco I, González M. Tlatenco: Tradición Herbolariay Remedios Caseros. Mexico City: Ce-Ácatl, A.C; 2003.
10. Gutierrez-Pajares JL, Zuniga L, Pino J. Ruta graveolens aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. Reprod Toxicol 2003; 17(6): 667-672.
11. Zeichen R, Rey A, Arganaraz E, Bindstein E. Perinatal toxicology of Ruta chalepensis (Rutaceae) in mice. J E Thnopharmacol 2000; 69(2): 93-98.
12. Kong YC, Lau CP, Wat KH, Ng KH, But PP, Cheng KF, et al. Antifertility principle of Ruta graveolens. Planta Med 1989; 55(2): 176-178.
13. Prakash AO, Saxena V, Shukla S, Tewari RK, Mathur S, Gupta A, et al. Anti-implantation activity of some indigenous plants in rats. Acta Eur Fertil 1985; 16(6): 441-448.
14. Conway GA, Slocumb JC. Plants used as abortifacients and emmenagogues by Spanish New Mexicans. J Ethnopharmacol 1979; 1(3): 241-261.
15. Wehr K. Criminal abortion using ruta roots (Ruta graveolens L.). Beitr Gerichtl Med 1974; 32: 126-131.
16. Diwan R, Shinde A, Malpathak N. Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of Ruta graveolensL.In Vitro Culture Lines. Hindawi Publishing Corporation. J Botany 2012; 1: 1-6.
17. Halvaei I, Roodsari HR, Harat ZN. Acute Effects of Ruta graveolens L. on Sperm Parameters and DNA Integrity in Rats. J Reprod Infertil 2012; 13(1): 33-38.
18. Martı´n-Coello J, Gonzalez R, Crespo C, Gomendio M, Roldan E.R.S. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (Mus musculus, Mus spretus and Mus spicilegus). Theriogenology 2008; 70(6): 1004-1013.
19. Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Gelpke DS, Hsueh AJW. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes thedevelopment of oocytes into preimplantation embryos. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102(26): 9206-9211.
20. Wang N, Le F, Zhan QT, Li L, Dong MY, Ding GL, et al. Effects of In Vitro Maturation on Histone Acetylation in Metaphase II Oocytes and Early Cleavage Embryos. Obstet Gynecol Int 2010: 1-9.

21. Gomendio M, Martin-Coello J, Crespo C, Magan˜a C, Roldan ER. Sperm competition enhances functional capacity of mammalian spermatozoa. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(41): 15113-1517.
22. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Technologies Laboratory and Clinical Perspectives. 3th ed. Florida: CRC Press; 2009.
23. Stochmal Ova A, Alexander S, Kadasi A, Alexa R. Physiological and Medical Effect of Plant Flavonoid Qurcetin. J Microbiol Biotechnol Food Sci 2013; 2(1): 1915-1926.
24. Khouri NA, El-Akawi ZA. Antiandrogenic activity of Rutagraveolens L in male Albino rats with emphasis on sexual and aggressive behavior. Neuro endocrinology Lett 2005; 26(6): 823-829.
25. Rahim F, Saki G, Bazrafkan M. Effect of alcohol extracts of the Ruta graveolens L. on the count, motility and in vitro fertilization capacity of rat's sperm. Asian J Plant Sci 2010; 9(1): 63-66.
26. Nasirinezhad F, Mirzakoochak KF, Parivar K, Amin G. Antifertility effect of aqueous extract of airal part of Rutagraveolenson immature female Balb/C mice. Physiol Pharmacol 2009; 13(3): 279-287.
27. Gutierrez-Pajares JL, Zuniga L, Pino J. Rutagraveolens aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. Reprod Toxicol 2003; 17(6): 667-672.