# بررسی اثر آنتی اسپرماتوژنز عصاره گیاه بومادران Achillea Millefolium L در موش سوری

دکترمحمدرضا جلالی‌ندوشن* ، دکترمحمدحسن قوسیان مقدم**
دکتر ویکتوریا چگینی***، دکترحسین جعفری****، دکترفرید زایری*****

* دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه پاتولوژی
** دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی
*** پزشک عمومی، دانشگاه شاهد، دانشکده پزشکی
**** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی
***** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه آمار زیستی

تاریخ دریافت مقاله : ۸۶/۱۲/۳
تاریخ پذیرش مقاله : ۸۷/۷/۱۸

Downloaded from zjrms.ir at 16:27 +0430 on Monday May 27th 2019

## چکیده

**زمینه و هدف:** یکی از اولویت های مهم در کشورهای در حال توسعه کنترل جمعیت می باشد .با توجه به اینکه داروهای پیشگیری کننده از بارداری تنها برای خانمها موجود می باشد، مطالعه جهت کشف داروهایی که بتواند بر روند اسپرماتوژنز در مردان موثر باشد حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق بررسی اثر عصاره گیاه بومادران .Achillea Millefolium L بر روند اسپرماتوژنز در موش های سوری بود.

**مواد و روش کار:** تعداد ۲۵ موش در ۵ گروه ۵ تایی با عصاره اتانولی، عصاره هیدروالکلی ، گروه شم برای هر دو گروه فوق و یک گروه کنترل بدون درمان مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تکمیل دوره درمان بیضه حیوانات مورد مطالعه هیستوپاتولوژی از نظر وجود سلولهای دژنره، سلولهای غول‌آسا، اسپرماتوژنز در توبولهای مختلف و بهم ریختگی ساختمانی قرار گرفت. همچنین اختلاف وزن حیوان قبل و بعداز مطالعه، و اندکس وزن گناد نیز در گروههای مختلف بررسی شد.

**یافته‌ها:** گروههای مورد مطالعه از نظر یافته‌های میکروسکوپی بصورت کمی اختلاف معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$) ولی توقف کامل اسپرماتوژنز در هیچکدام از گروهها مشاهده نشد. اختلاف وزن بدن و اندکس وزن گناد در گروههای مختلف معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** اگرچه اختلاف کمی یافته‌های میکرسکپی در بین گروههای مختلف معنی‌دار می‌باشد ولی با توجه به عدم توقف کامل اسپرماتوژنز در مورد اثر ضدبارداری این گیاه نمی‌توان نتیجه قطعی گرفت.(**مجله طبیب شرق، دوره۱۰، شماره۳، پائیز ۱۳۸۷، ص ۲۱۹ تا۲۲۵)**

**کلیدواژه ها: اسپرماتوژنز، بومادران، بیضه، عصاره، موش**

## مقدمه

کنترل جمعیت به وسیله روشهای پیشگیری از بارداری یکی از مسائل مهم جوامع امروز به خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. در حال حاضر روشهای دارویی مطرح برای پیشگیری قطعی از بارداری، استفاده دارو توسط خانم‌هاست. با توجه به نقشی که هر دو جنس در کنترل جمعیت می توانند داشته باشندو از آنجا که در بعضی موارد به دلایلی منع استفاده دارو در زنان وجود دارد لازم است روشهای دارویی پیشگیری از بارداری برای مردان نیز وجود داشته باشد. در طب سنتی کشورهای مختلف، داروهای متعددی برای پیشگیری از بارداری وجود دارد یکی ازاین موارد، گیاه دارویی بومادران (Yarrow) Achillea Millefolium L است.این گیاه بیش از ۳۰۰۰سال است که استفاده دارویی دارد و ترکیبات اصلی آن شامل کافور Myrcen، سینئول،کاریوفیلن و لینالول می باشد.[۱،۲] این گیاه بیشتر بعنوان داروی ضد خونریزی، محرک ترمیم ، درمان

آدرس نویسنده مسئول: دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد Email: jalali@shahed.ac.ir

Downloaded from zjrms.ir at 16:27 +0430 on Monday May 27th 2019

زخم،مسکن واسپاسمولیتیک،مصرف می‌شده است[۳-۵] همچنین برای یکی از مشتقات آن خواص ضد توموری گزارش شده است.[۶] قبایل سنتی اروپای شمالی و آمریکای شمالی آن را بعنوان داروی پیشگیری از بارداری، محرک سقط و محرک قاعدگی مورد استفاده قرار می‌دادند.[۷] اثر این گیاه بر روی باروری و اسپرماتوژنز در چند مطالعه بررسی شده است اما نتایج متناقضی گزارش شده است.[۷-۹] مطالعات فیتوشیمیایی مختلف اجزا تشکیل دهنده این گیاه رامشخص نموده اند اما فقط چند مطالعه ارتباط این ترکیبات را با فعالیتهای فارماکولوژیک به اثبات رسانده است.[۴] علی رغم اینکه سازمان دارو وغذای آمریکا این گیاه راغیرسمی معرفی کرده است[۴] اما بعضی اثرات سمی آن در انسان وحیوانات گزارش شده است.اثرات سمی گزارش شده در انسان شامل درماتیت تماسی،سردرد وسرگیجه می باشد.[۴و۱۰]

بر این اساس در این مطالعه اثر عصاره گیاه بومادران بر روند اسپرماتوژنز و تغییرات کمی در سلولهای زایگر بیضه مورد بررسی قرار گرفته است .

## روش کار

موشهای نر بالغ نژاد Swiss Albin به تعداد ۲۵ رأس به وزن متوسط ۲۵ گرم از موسسه تحقیقاتی رازی کرج تهیه شد و با در نظر گرفتن پروتکلهای اخلاق در پژوهش حیوانات آزمایشگاهی در دانشکده پزشکی شاهد مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات بصورت تصادفی در ۵ گروه بطور مساوی تقسیم شدند محل نگهداری حیوانات درجه حرارت ۲۵°C داشته و محیط اتاق ۱۲ ساعت روشن و ۱۲ ساعت تاریک بود. حیوانات از آب شهر و غذای مخصوص استفاده می‌کردند.

گیاه مورد مطالعه گل بومادران آسیاب شده بود که به روشهای زیر برای مطالعه در گروههای مختلف عصاره گیری و آماده گردید[۶]:

الف) عصاره اتانولی : ۵۰ گرم از پودر گل بومادران با ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ با حرکت مداوم بمدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق بادستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره الکلی تهیه شده در دمای اتاق در Tween 20 (Sigma) بصورت سوسپانسیون درآمده و در سالین ۰/۱۵mol/L رقیق شد.[۹] ب) عصاره هیدروالکلی: در دمای اتاق ۱۰۰ گرم از پودر گل بومادران با ۸۰۰ میلی‌لیتر از اتانول ۸۰٪ با حرکت دائمی در درجه حرارت اتاق بمدت ۷۲ ساعت بادستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره هیدروالکلی در Tween 80 (Sigma) بصورت سوسپانسیون درآمده و در آب مقطر رقیق شد.[۹] هر دو نوع عصاره در دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ گردیدند. به منظور بررسی آثار بیولوژیک عصاره گیاه وتزریق آن به حیوانات ابتدا LD50 (Lethal dose) تعیین گردید و با کاهش آن مقدار دوز آستانه ای مشخص گردید . به منظور محاسبه دوزی از عصاره که در ۵۰ درصد حیوانات مورد مطالعه اثر کشندگی داشته باشد از برنامه کامپیوتری PCS وبر اساس روش ویلکوسن – لیچفیلد استفاده شد [۱۱]

نحوه تجویز گروه اول : عصاره الکلی Tween 20 با دوز ۲۰۰mg/kg روزانه به صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۲۰ روز تجویز گردید.[۹] گروه دوم : فقط حلال با همان مقدار گروه یک در مدت مشابه بصورت داخل صفاقی دریافت کردند.گروه سوم : عصاره هیدروالکلی با دوز ۳۰۰mg/kg روزانه به صورت خوراکی به مدت ۳۰ روز دریافت کردند.گروه چهارم : فقط حلال Tween 80 را بصورت خوراکی مشابه با گروه سوم دریافت کردند وگروه پنجم : بعنوان گروه کنترل هیچ ترکیبی دریافت نکردند.

حیوانات قبل از شروع و بعداز پایان درمان وزن شدند. دو هفته پس از پایان درمان تمام حیوانات بوسیله اتر بیهوش شده و گنادها(هر دو بیضه) ازنسوج اطراف جدا شده واز بدن خارج و وزن گردیدند سپس اندکس وزن بیضه بوسیله فرمول زیر محاسبه گردید[۶]:

$$\text{اندکس وزن بیضه} = \frac{\text{وزن بیضه}}{\text{وزن حیوان}} \times ۱۰۰$$

Downloaded from zjrms.ir at 16:27 +0430 on Monday May 27th 2019

سپس گنادها برای بررسی پاتولوژی در محلول بوئن قرار گرفته و پس از فیکساسیون در فرمالین بافره ۱۰٪ به روش روتین هیستوپاتولوژی با دستگاه Tissue processor آماده سازی (Processing) شده از هر نمونه برشهای متعدد ۵ میکرونی به وسیله دستگاه میکروتوم تهیه و به روش روتین با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدو نمونه ها به وسیله میکروسکپ نوری Zeiss مدل Standard 20 در بزرگنمایی ۴۰۰ مورد مطالعه قرار گرفتند. متوسط تعداد سلولهای دژنره و غول‌آسا در هر توبول پس از مشاهده حداقل ۵۰ توبول تعیین گردید همچنین درصد توبولهای دارای اسپرم بالغ و توبولهایی که بهم ریختگی ساختمانی (Dysorganization) داشتند بوسیله شمارش ۱۰۰ توبول تعیین گردید.

اطلاعات حاصله شامل اختلاف وزن حیوان در گروههای مختلف قبل و بعداز درمان، تعداد متوسط سلولهای دژنره و غول‌آسا، درصد توبولهای د ارای اسپرم بالغ و بهم ریختگی ساختمانی، و اندکس وزن بیضه برای هرگروه گزارش شد .به منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین گروهها از آزمون ANOVA و آزمون توکی استفاده شد وحد خطای $P<0.05$ به لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد .

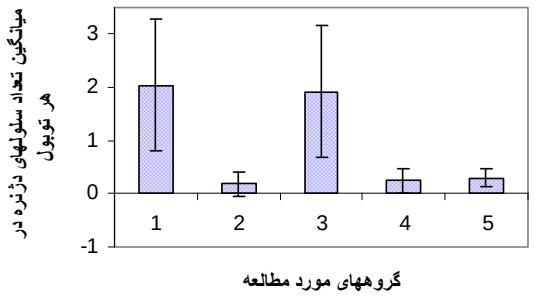
## یافته ها

یافته‌های مربوط به اختلاف وزن حیوانات قبل وبعد از مطالعه واندکس وزن گناد در گروههای مختلف در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

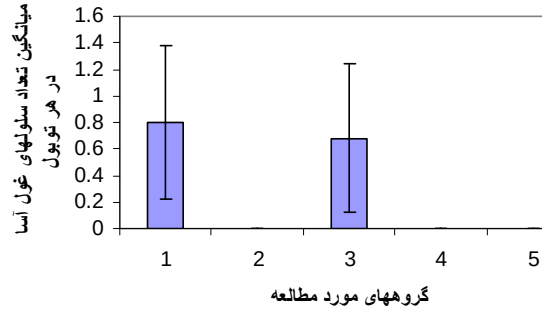
از نظر دو یافته ماکروسکپی (اختلاف وزن قبل و بعداز مطالعه، و اندکس وزن گناد بعداز مطالعه) اختلاف بین گروههای مختلف با تست آماری آنالیز واریانس (ANOVA) معنی‌دار نبود. اختلاف متوسط تعداد سلولهای دژنره در هر توبول منی‌ساز (P=۰/۰۰۱) و متوسط تعداد سلولهای غول‌آسا در هر توبول در گروههای مختلف بوسیله آماره ANOVA معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۲) (نمودار۲و۱). بین عصاره اتانولی وهیدرو الکلی از نظر یافته های ماکروسکوپی با استفاده از تست توکی اختلاف معنی داری وجود نداشت به عبارتی این دو عصاره اثرشان با یکدیگر مشابه و با سایر گروهها متفاوت بود. درصد توبولهای دارای اسپرم بالغ با آماره ANOVA در گروههای مختلف تفاوت معنی‌داری داشت(P=۰/۰۰۱) که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.

در نمای میکروسکپی گناد در هر گروه اختلاف واضح بین توبولهای مختلف وجود داشت یا به عبارتی همه توبولها بصورت یکسان تحت تأثیر عصاره گیاه قرار نگرفته بودند و بصورت کلی در هیچ کدام نمونه‌های مورد مطالعه توقف کامل اسپرماتوژنز و عدم وجود اسپرم بالغ را نشان ندادند.

نمودار 1:میانگین تعداد سلولهاي دژنره در هر توبول در گروههاي مختلف مورد مطالعه

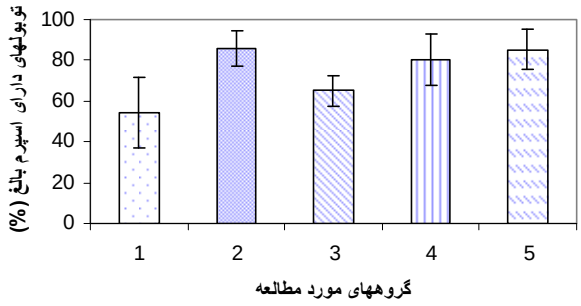



نمودار 2:میانگین تعداد سلولهاي غول آسا در هر توبول در گروههاي مختلف مورد مطالعه



Downloaded from zjrms.ir at 16:27 +0430 on Monday May 27th 2019

نمودار 3:درصد توبولهاي داراي اسپرم بالغ در گروههاي مختلف مورد مطالعه




جدول ۱ : یافته‌های مربوط به اختلاف وزن بدن و اندکس وزن گناد، در گروههای مختلف مورد مطالعه

| یافته‌ها / گروهها | اختلاف وزن قبل و بعداز مطالعه(گرم) | اندکس وزن گناد(گرم) |
|---|---|---|
| اول | ۶/۰±۱/۱۶ | ۳۰۶/۶۰±۱۴/۳۲ |
| دوم | ۶/۲۸±۱/۳۹ | ۳۰۴/۰۰±۱۴/۱۹ |
| سوم | ۶/۷۰±۲/۱۸ | ۳۰۲/۸۰±۱۰/۶۵ |
| چهارم | ۷/۹۴±۳/۷۸ | ۳۰۵/۸۰±۱۶/۲۵ |
| پنجم | ۴/۳۲±۱/۰۷ | ۳۰۴/۶۸±۱۶/۰۱ |

## بحث

یافته‌های این مطالعه نشانگر تاثیرعصاره گیاه بو مادران بر افزایش متوسط تعداد سلولهای دژنره و سلولهای غول آسا در هر توبول وکاهش اسپرماتوژنز در این توبولها است. این یافته ها را می‌توان به سه دسته یافته‌های مربوط به اختلاف وزن و اندکس وزن گناد، میکرسکپی کمی و میکرسکپی کیفی تقسیم کرد.

در مورد اختلاف وزن بدن و اندکس وزن گناد نتیجه مشابهی توسط Montanari T گرفته شده است و این نکته بیانگر این می‌باشد که تغییرات ایجاد شده در گنادها در سطح سلولی بوده و اندکس وزن گناد و وزن بدن تحت تأثیر عصاره نمی‌باشد.[۹] در مطالعه دیگری که توسط Cavalcanti و همکاران بر روی موش صحرایی Ratصورت گرفته نیز اختلاف معنی داری بین وزن حیوانات دریافت کننده داروی بومادران و گروه کنترل دیده نشده که این مطلب با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد.[۴]

همچون یافته های مطالعات تجربی دیگر با استفاده از موادی مثل ۵ – آمینواینـدازول ،[۱۲] گوسیپول [۱۳] و Trypterygium wilfordii[۱۴] در مطالعه ما نیز دژنراسیون و مرگ سلولی در نمای میکروسکوپی گنادها قابل مشاهده است که بیانگر اثرات آنتی اسپرماتوژنیک بومادران و این مواد می‌باشد. مطالعات فوق بصورت کیفی این یافته را بررسی نمودند ولی در مطالعه ما این یافته بصورت کمی بررسی شده است. وجود سلولهای غول‌آسا که فقط در گروههای تحت درمان با بومادران مشاهده شده است نیز بیانگر اثرات گیاه بومادران بر روی سلولهای زایگر می‌باشد. ایجاد سلولهای غول آسا در مطالعات دیگری که با استفاده از پروپیونات تستوسترون [۱۵] و ۵- تیو-D- گلوکز[۱۶] انجام گرفته نیز دیده شده است که احتمالاً این اثر بوسیله دخالت بعضی از سیتوکینها ایجاد می‌گردد. نکته قوت مطالعه ما بررسی این یافته میکروسکپی بصورت کمی و مشاهده اختلاف آن در گروههای مختلف است. هر دو اثر دژنراسیون و ایجاد سلول غول‌آسا در مطالعه مشابه دیگری که بوسیله Montanari T انجام شده نیز مشاهده گردیده است.[۹] ولی این محقق این اثرات را تنها بصورت کیفی بررسی نموده است.

در مطالعه Dalsenter که برروی موش صحرایی انجام شده اگر چه بررسی هیستولوژیک انجام نشده ولی شمارش اسپرم واشکال غیر طبیعی بررسی شده اند.در این مطالعه گرچه اختلاف معنی داری بین گروه کنترل ودرمان وجود نداشته ولی درصد اشکال غیر طبیعی بین دو گروه اختلاف معنی داری داشته است[۱۷] که به نوعی تائید کننده مطالعه ما می باشد که در گروههای درمان شده اسپرم بالغ در بسیاری از توبولها دیده می شود و در صورت آنالیز اسپرم ممکن است شمارش طبیعی را نشان دهد همچنین مشاهده اشکال غیر طبیعی موجود در توبولها با مطالعه Dalsenterمطابقت دارد

اما یافته مهمی که استفاده از بومادران را در حال حاضر به عنوان یک ماده دارای خاصیت آنتی اسپرماتوژنز مورد سؤال قرار می‌دهد یکسان نبودن اثر آن در توبولهای مختلف می‌باشد

بطوریکه در بعضی از توبولها اسپرم بالغ به تعداد زیاد بعد از دوره درمانی وجود دارد و از آنجا که این اسپرمهای بالغ حتی در تعداد کم می‌توانند موجب باروری شوند در حال حاضر نمی‌توان اثر قطعی پیشگیری از بارداری را برای این گیاه دارویی عنوان کرد. همین نتیجه از مطالعه مشابه دیگری که توسط Montanari T انجام شده به دست آمده است.

اگرچه این مطالعه اثرات گیاه بومادران را بر روی اسپرماتوژنز نشان داده است ولی بعلت اثر غیریکسان آن بر روی توبولهای منی‌ساز و وجود اسپرم بالغ بعداز دوره درمانی در حال حاضر بعنوان یک ماده مؤثر برای پیشگیری از بارداری توصیه نمی‌گردد و لازم است مطالعات کاملتری برای ردیا اثبات اثر آن در پیشگیری از بارداری صورت پذیردولی این مطالعه می تواند بیانگر اثرات توکسیک این گیاه دارویی بر روی سلولهای زایگر بیضه باشد.

## سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجویی جهت اخذ دکترای حرفه ای پزشکی خانم ویکتوریا چگینی می باشد که طرحنامه آن در شورای پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد به تصویب رسیده است.

## *References*

1. Innocenti G, Vegeto E, Dall'Acqua S, et al. In vitro estrogenic activity of Achillea millefolium L. hytomedicine 2007; 14:147-152
2. Mitich LW. Intriguing world of weeds Yarrow-the herb of Achilles. Weed Technology 1990;4:451-453.
3. Chandler RF, Hooper SN, Harvey MJ. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, Achillea Millefolium, Compositae. Econ Bot 1982; 36:203-223.
4. Cavalcanti AM, Baggio CH, Freitas CS, et al. Safety and antiulcer efficacy studies of Achillea millefolium L. after chronic treatment in Wistar rats. J Ethnopharmacol 2006 19; 107(2):277-284.
5. Benedek B, Kopp B, Melzig MF. Achillea millefolium L. is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? J Ethnophamacol 2007; 113(2):312-317
6. Tozyo T, Yoshimura Y, Sakurai K, et al. Novel antitumor sesquiterpenoids in Achillea millefolium. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1994; 42(5):1096-1100.
7. De Laszlo H, Henshaw PS. Plant materials used by primitive peoples to affect fertility. Science 1954;119(3097):626-631.
8. Barnes CS, Price JR, Hughes RL. An examination of some reputed antifertility plants. Lloy dia 1975; 38:135-140.
9. Montanari T, de Carvalho JE, Dolder H. Antispermatogenic effect of Achillea millefolium L. in mice. Contraception 1998; 58:309-313.
10. Hausen BM, Breuer J, Weglewski J, et al. alpha-Peroxyachifolid and other new sensitizing sesquiterpene lactones from yarrow (Achillea millefolium L., Compositae). Contact Dermatitis 1991; 24(4):274-280.

Downloaded from zjrms.ir at 16:27 +0430 on Monday May 27th 2019

11. Mali PC, Ansari AS, Chaturvedi M. Antifertility effect of chronically administered Martynia annua root extract on male rats. J Ethnopharmacol 2002;82:61-67
12. Lobl TJ, Porteus SE. Antispermatogenic effects of 5-aminoindazole in rats. J Reprod Fertil 1977; 50(2):371-372.
13. Haider SG, Passia D, Chen KQ, et al. Reversible changes in rat spermatogenesis induced by an antifertility substance (Gossypol). A histochemical report. Acta Histochem 1985; 77(2):185-191.
14. Qian SZ, Zhong CQ, Xu Y. Effect of tripterigium wilfordii Hook. F. on the fertility of rats. Contraception 1986; 33(2):105-110.
15. Abdi SHM, Hasan W. Effect of testosterone of the histological structure of the testis of adult albino rats. Indian J Med Res 1973; 61:1207-211.
16. Majumdar SK, Udelsman R. Fine structure of mouse testes following intraperitoneal treatment with 5-thio-D-glucose. J Heredity 1979; 70:194-198.
17. Dalsenter PR, Cavalcanti AM, Andrade AJ, et al. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of Achillea millefolium L. (Asteraceae) in Wistar rats. Reproduc Toxicol 2004; 18:819-823.

Downloaded from zjrms.ir at 16:27 +0430 on Monday May 27th 2019

# *Evaluation of Antispermatogenic Effects of Yarrow in Mice*

**Jalali Nadoushan MR, PhD*; Ghosian Moghaddam MH, PhD*;**
**Chegini V, MD*; Jafari H , PhD*; Zaeri F, PhD***

**Received: 22/Feb/2008**
**Accepted: 9/Oct/2008**

Downloaded from zjrms.ir at 16:27 +0430 on Monday May 27th 2019

***Background:*** *Male contraception is necessary for control of population growth in developing countries. There are several methods for contraception in females but there is no definite method for males. In this study, we evaluated the effects of yarrow extract on spermatogenesis in Suri mice.*

***Materials and Methods:*** *Twenty five mice were divided into 5 groups. They were treated by ethanolic extract, hydroalcoholic extract, sham groups for them and control group. After treatment period, their testes were studied histologically. Degenerated cells, giant cells, complete spermatogenesis in different tubules and disorganization were evaluated. Difference between pretest and posttest body weight and gonadal weight index were also evaluated.*

***Results:*** *There were statistically significant difference between groups for degenerated cells, giant cells, complete spermatogenesis in different tubules and disorganization ($P<0.05$). The difference between pretest and posttest body weight and gonadal weight index were not statistically significant. No complete maturation arrest was noted in the specimens.*

***Conclusion:*** *Although a quantitative difference was noted between groups, but we cannot recommend yarrow for male contraception, because it could not stop spermatogenesis completely.*

***KEY WORDS:*** *Spermatogenesis, Yarrow, Testis, Extract, Mice*

***Dept of Pathology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.**
**** Dept of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.**
***** Faculty of Medicine, Shahed University**
****** Dept of Pharmacology, Faculty of medicine, Qazvin University of Medical Sciences and Health Services, Qazvin, Iran.**
******* Dept of Biostatics Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.**