اثرات کورکومین بر پارامترهای تولید مثلی در موش آزمایشگاهی نر

محمد رضا سلحشور[۱]، سیروس جلیلی[۱*]، مظفر خزاعی[۱]، فوزیه خانی[۲]

۱- مرکز تحقیقات باروری و نا باروری، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه ، کرمانشاه ، ایران
۲- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه ، ایران
*عهده دار مکاتبات: کرمانشاه ، دانشکده پزشکی مرکز تحقیقات باروری و نا باروری Email: cjalili@yahoo.com

---

چکیده

زمینه: نـاباروری یکـی از مشکلات بهداشتی است که آثار سوء خود را در زمینه های فردی ، اجتماعی و اقتصادی بر جا می گذارد. علل ناباروری در مردان را مربوط به اختلالات اسپرم شامل تعداد کم اسپرم ، عدم بلوغ اسپرم ، شکل غیر طبیعی اسپرم و عدم توانایی حـرکت مـناسب اسپرم بر شمرده اند. رنگ زرد چوبه ناشی از ماده ای به نام کورکومین است که برخی از خواص انتی اکسیداتیو و ضد التهابی آن مشخـص شده است. اگرچه محققان به اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین اشاراتی داشته اند اما اثرات آن بر هورمون های تولید مثلی، مجرای اپیدیدیم و تحرک پذیری اسپرم ها مشخص نیست.

روش ها: در این مطالعه دوزهای مختلف کورکومین (۶۰ و۳۰، ۱۰میلی گرم/ کیلوگرم۱۰) در ۲۸ روز متمادی به صورت داخل صفاقی به موشهای نر تزریق شد و پارامترهای تولید مثلی نظیر میزان هورمون تستوسترون، تحرک و مورفولوژی اسپرم ها به همراه وزن و هیستولوژی بیضه ها مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: بر اساس نتایج، تجویزکورکومین موجب افزایش معنی داری با افزایش دوز در مقادیر شاخص ها ی تولید مثلی مانند تحرک ، تعداد ، مرفولوژی نرمال اسپرم ها و میزان هورمون تستوسترون در بسیاری از گروه های مورد بررسی شد($P<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: به نظر میرسد کورکومین می تواند باعث افزایش کیفیت و کمیت شاخص های تولید مثلی شود.

کلید واژه ها: کورکومین، پارامترهای تولید مثلی، موش آزمایشگاهی نر

مقدمه:

ناباروری یکی از مشکلات بهداشتی است که آثار سوء خود را در زمینه های فردی ، اجتماعی و اقتصادی بر جا می گذارد و در ۱۰ تا ۱۵٪ از زوج ها دیده می شود(۱). حدود ٤۰٪ از مشکلات ناباروری مربوط به مردان می باشد (۲). علل ناباروری در مردان را مربوط به اختلالات اسپرم شامل تعداد کم اسپرم ، عدم بلوغ اسپرم ، شکل غیر طبیعی اسپرم و عدم توانایی حرکت مناسب اسپرم بر شمرده اند(۳). امروزه استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه بسیاری قرار گرفته و از آنجا که مواد موثر موجود در داروهای گیاهی به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر از یک حالت تعادل بیولوژیکی برخوردار هستند لذا در بدن انباشته نشده و فاقد عوارض جانبی یا عوارض جانبی کمتر می باشد و از این لحاظ برتری قابل ملاحظه ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند(٤). زردچوبه با نام علمی Curcuma longaاز خانواده Zingiberaceae یکی از قدیمی ترین گیاهان است که از قدیم در طب سنتی کاربردهای فراوانی داشته و از آن برای تصفیه خون ، هضم غذا ، درمان آرتریت ، محافظت کبد و بعنوان عامل ضد التهابی استفاده شده است(۵) پودر آسیاب شده ی آن نیز قرن ها به عنوان چاشنی ، نگهدارنده غذا و ماده رنگی استفاده می شود. رنگ زردچوبه ناشی از ماده ای به نام کورکومین (C21H20O6) است که ۳ تا ٤٪ آن را تشکیل می دهد (٦). تحقیقات متعددی مبنی بر خواص آنتی اکسیدانت، اثرات ضد موتاسیون، ضد تومور و خاصیت کارسینوژیک کورکومین گزارش شده است(۷). کورکومین با مهار فسفوریلاسیون فسفو لیپاز A2 (PLA2) و کاهش بیان ژن COX-2 و مهار فعالیت کاتابولیت COX-5 بر روی متابولیسم اسید آراشیدونیک اثر می گذارد . این اثرات باعث فعالیت و خاصیت ضد التهابی کورکومین می شود(۸). علاوه بر این کورکومین بیان سیتوکین های التهابی گوناگون مثل IL-1 و TNF α و IL-6 و کموکین ها را کاهش می دهد(۹). اگرچه محققان به اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین اشاراتی داشته اند اما اثرات آن بر هورمون های تولید مثلی، مجرای اپیدیدیم، تعداد و تحرک پذیری اسپرمها مشخص نیست. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر محافظتی کورکومین بر روی آسیب های القا شده توسط نیکوتین بر پارامترهای تولید مثلی موش کوچک آزمایشگاهی نر طراحی گردید .

مواد و روش ها:

پودرکورکومین($C_{21}H_{20}O_6$) خریداری شد(Merk-Germany) و جهت تهیه دوزهای مختلف، این پودر در اتانول ۷۰٪ (C_2H_5OH) حل و توسط نر مال سالین رقیق شد.

در این مطالعه تجربی، ٤۲ موش کوچک آزمایشگاهی نر بالغ با وزن ۲۵ الی ۳۰ گرم از مؤسسه رازی تهران خریداری شد. حیوانات تحت شرایط آزمایشگاهی در دمای۲± ۲۲ درجه سانتی گراد و شرایط محیطی کنترل شده شامل سیکل های ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی و آب و غذای کافی و در

دسترس قرار گرفتند(۱۰). حیوانات به طور اتفاقی به ۳ گروه هفت تایی تقسیم شدند و برای هر گروه یک گروه کنترل مجزا در نظر گرفته شد. به گروه های کنترل اتانول(۱میلی لیتر/ کیلو گرم) تزریق شد و گروه های مورد آزمایش، کورکومین را در سه دوز (٦٠و۱۰,۳۰ میلی گرم / کیلوگرم) برای مدت ۲۸ روز متمادی دریافت کردند(۱۱). حیوانات ٢٤ ساعت بعد از آخرین تزریق حیوانات بیهوش شدند. خون از طرق قلب حیوانات گرفته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید (۱۰۰۰ دور در ثانیه). سرم حاصله جدا و تا مرحله بعد آزمون در فریزر ۲۰- نگه داری شد. اندازه گیری میزان هورمون تستوسترون از سرم حاصله توسط روش الایزا و بر اساس روش کیت به انجام رسید. در مرحله بعد بیضه ها از حیوان جدا و پس از جدا کردن چربی و اپی دیدیم از آنها، هر یک به طور جداگانه وزن شده، میانگین حاصل مورد بررسی قرار گرفت و جهت مراحل بافت شناسی بعدی در بافر فرمالین ۱۰٪ نگهداری شد(۱۲).

بخش دم اپیدیدیم از آنها جدا شد و به صورت قطعات کوچک درمحیط کشت سلولیDMEM/F12 حاوی ۵٪ سرم گاوی (FBS) ، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO2 قرار داده شد. سوسپانسیون بدست آمده جهت آنالیز پارامترهای اسپرم شامل، تعداد، تحرک پذیری و مورفولوژی مورد استفاده قرار گرفت. تحرک اسپرمها به ٤ سطح تقسیم بندی شد: بدون حرکت(۰)، حرکت بسیار ناچیز(۱)، حرکات چرخشی(۲) و تحرک پذیری بالا(۳) (۱۳).

جهت شمارش اسپرم ها، از لام نئو بار (Neubauer) استفاده شد. جهت بررسی مورفولوژی اسپرم ها، از روش رنگ آمیزی پاپا نیکولا(Papanicohaou)و بر اساس روش خاص این رنگ آمیزی استفاده شد. برای اندازه گیری تحرک پذیری، یک قطره از سوسپانسیون اسپرمی روی لام ریخته شده و تعداد اسپرم های متحرک و غیرمتحرک توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی ٤٠ مورد بررسی قرار گرفت(١٤) .

جهت بررسی های باقت شناسی مراحل مختلف این پروسه شـامل آب گیری ، شفاف سازی و قـالب گیری انجام شد. برش های میکروسکوپی (۵ میکرو متر) آماده شده و از روش رنگ آمیزی H&E استفاده شد. قطر لوله های سمینفروز به وسیله دوربین و نرم افزار موتیک (Moticam 2000, Spain) بر حسب میکرومتر برای هر بیضه تعیین گردید (شکل۱) (۱۲) .

نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کروسکال والیس انجام گرفت. برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS 16 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد.

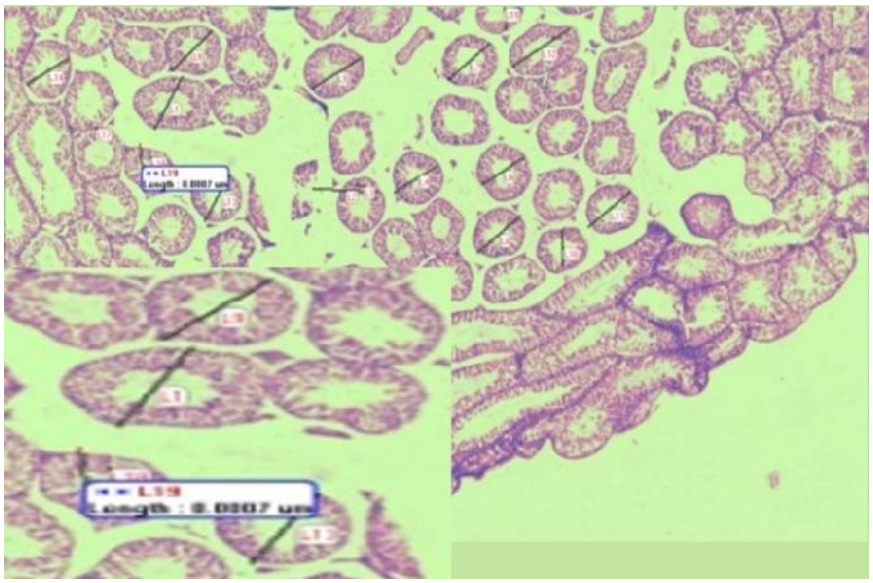
یافته ها:

پس از اطمینان ازنرمال بودن دادها با استفاده از آزمون کروسکال والیس و آنالیز آماری نتایج زیر حاصل شد. اثر کورکومین با افزایش دوز، موجب افزایش میانگین وزن بیضه موش ها شد که این افزایش در دوزهای mg/kg ٦٠ و ۳۰

نسبت به گروه کنترل معنی دار بود (P<۰/۰۵). (جدول۱).اثر کورکومین با افزایش دوز، موجب افزایش معنی داری در تحرک، تعداد و مورفولوژی نرمال اسپرم ها در تمام گروه های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۵)(جدول۲).

اثر کورکومین با افزایش دوز موجب افزایش معنی داری در قطر لوله های سمینفروز در تمام گروه های مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل شد(P<۰/۰۵).(جدول۲).

میزان هورمون تستوسترون با افزایش دوز تحت تاثیر کورکومین افزایش معنی داری را در تمام گروه های مورد مطالعه نشان داد (P</۰۵)(۰جدول۳).



شکل۱) بررسی قطر لوله های سمنیفروز بوسیله دوربین و نرم افزار موتیک. تاثیرکورکومین(۱۰ ml/kg). بزرگنمایی (۱۰ x).

جدول ۱): مقایسه وزن بیضه های موش سوری در گروه های مختلف(mean ± SD). * (P<۰/۰۵) در گروه های تیمار شده نسبت به گروه کنترل.

وزن	کنترل	۱۰ mg/kg	۳۰ mg/kg	٦۰ mg/kg
وزن بیضه چپ(گرم)	۰/۱±۰/۰۰۱	۰/۱۰٤±۰/۰۰۲	۰/۱۰٦±۰/۰۰۲	۰/۱۰٦±۰/۰۰۲
وزن بیضه راست(گرم)	۰/۱۰۲±۰/۰۰۲	۰/۱۰۵±۰/۰۰۳	۰/۱۰۸±۰/۰۰۱	۰/۱۱۰±۰/۰۰۲
میانگین وزن بیضه ها(گرم)	۰/۱۰۱± ۰/۰۰۱	۰/۱۰٤± ۰/۰۰۲	۰/۱۰۷± ۰/۰۰۱ *	۰/۱۰۸± ۰/۰۰۲ *

جدول ۲: مقایسه تعداد، مورفولوژی، قطر لوله های سمینفروز و تحرک پذیری اسپرمهای موش سوری در گروه های مختلف . (mean ± SD) *(P<۰/۰۵) در تمام گروه های تیمار شده نسبت به گروه کنترل.

پارامترهای اسپرم	کنترل	۱۰ mg/kg	۳۰ mg/kg	۶۰ mg/kg
تعداد(10^4)	۱/۵۰±۰/۳۸	۱/۵۷/۷٤±۰/۱۷	۱ /٦۲±۰/۲٤	* ۱/۹۹±۰/۱۸
مورفولوژی اسپرم نرمال (درصد)	۸٤/۵۷±۱/۸	۸٤/۸۵±۱/۰۲	* ۸۵/٤۲±۱/۹٤	۸۷/۷۱±۳/۸
قطر لوله های سمینیفروز(mμ)	۱۹/۵±۰/٤۷	۱۹/۵±۰/۵۲	* ۱۹/۷±۰/۳٦	۱۹/۷±۰/٦۱
تحرک پذیری بالا	۱۸/۷±۰/۹	* ۲۷/٤۲±۱/۱	۲۷/٤۲±۱/۱	۳۱/۵۷±۱/۵

جدول ۳) : مقایسه هورمون تستوسترون در گروه های مختلف . (mean ± SD) .*(P<۰/۰۵) در تمام گروه های تیمار شده

گروه های مورد بررسی	کنترل	۱۰ mg/kg	۳۰ mg/kg	۶۰ mg/kg
هورمون تستوسترون(ng/ml)	۰/۳۲۸±۰/۰۷	۰/٤±۰/۰۸	* ۰/۵۲۸±۰/۰۷	۰/٦±۰/۰۸

بحث:

مهمترین یافته مطالعه حاضر، تأثیرات مثبت کورکومین بر پارامترهای اسپرم و اجزاء تناسلی در موش های کوچک آزمایشگاهی بود. در مطالعه حاضر کورکومین تغییرات معنی داری در مقادیر شاخص های تولید مثلی ایجاد کرد. امروزه گیاهان دارویی کاربرد زیادی دارند و یکی از بافتهای هدف برای عصاره های گیاهی، ارگانهای تولید مثلی از قبیل بیضه و پارامترهای اسپرم هستند. به نظر می رسد در گروه های تیمار شده کورکومین از طریق افزایش دفاع آنتی اکسیدانتی بدن باعث افزایش میانگین تحرک پذیری و شمارش اسپرم های طبیعی شده باشد (۱۵). کورکومین می تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده وبا افزایش بیان ژن های آنتی اکسیدانی باعث بهبود کیفیت اسپرم شود. نتایج حاصل در راستای نتایج Kalpana و همکاران بود که به بررسی اثرات نسبی پراکسیداسیون و آنتی اکسیدانتی کورکومین بر روی بافت چربی سمی شده توسط نیکوتین پرداختند و مشاهده کردند که کورکومین می تواند سمیت القا شده توسط نیکوتین را بر روی بافت چربی کاهش دهد (۱٦). از آنجا که سلول های زایای اسپرم به دلیل داشتن مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع، چندین پیوند دوگانه در غشای پلاسمایی و میزان ناچیز آنتی اکسیدان های سیتوپلاسمی در برابر آسیبهای اکسیداتیوی بسیار حساس هستند(۱۷)، بنابراین اکسید شدن اسید های چرب غشاء منجر به از دست رفتن سیالیت غشاء و کاهش در فعالیت آنزیم ها و کانال های یونی اسپرم خواهد شد. به نظر می رسد پاکسازی عوامل اکسیداتیو توسط موادی نظیر کورکومین بتواند

در درمان و جلوگیری از بروز بیماری های مربوط به اسپرم مفید باشد. نتایج مطالعه حاضر تایید کننده یافته هایShan و همکاران است که نشان دادند از کورکومین می توان به عنوان یک ماده آنتی اکسیدانی قوی در برابر استرس های اکسیداتیوی و اثرات ناشی از آن استفاده کرد (۱۸). تحرک اسپرمها یکی از فاکتورهای مهم در ایجاد باروری به روش طبیعی است و علت بسیاری از ناباروری ها تحرک پایین اسپرم بوده است(۱۹). به نظر می رسد افزایش تحرک اسپرم ها توسط کورکومین در مطالعه حاضر به دلیل مهار فعالیت Cannabinoids (این عامل از طریق فعال کردن رسپتورهایCB1 در اسپرم بالغ موجب کاهش حرکت اسپرم می شود)توسط کورکومین باشد (۲۰). مطالعه حاضر اثرات افزایش دهنده کورکومین را بر وزن بیضه نشان داد. به نظر می رسد این امر مربوط به اثرات اشتها اور کورکومین در حیوانات مورد آزمایش باشد.

نتیجه گیری: به طور کلی به نظر می رسد مکمل های آنتی اکسیدانی گیاهی نظیر کورکومین می توانند باعث افزایش کیفیت و کمیت شاخص های تولید مثلی شوند.

تقدیر و تشکر:

این مقاله از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به شماره ۹۱۳۲۶ استخراج شد. بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که ما را در این طرح یاری نمودند کمال تشکر را داریم.

References:

1- Ikechebula JI, Adinma JI, Orie EF, Ikegwuonu SO. High prevalence of male infertility in southeastern. Nigeria J obs Gyneco 2003; 23(6): 657-9.

2- Razzak AH, Wais SA. The infertile couple:a cohort study in duhok, Iraq. Est mediterr Health J 2002; 8(2-3): 234-238.

3- Araoye MO. Epidemiology of infertility: social problems of the infertile couples.West Afr J Med 2003; 22(2): 190-6.

4- Ahmed M, Khan M.I, Khan M.R, Muhammad N, Khan AU. Role of Medicinal Plants in Oxidative Stress and Cancer. *Ganoderma lucidum* 2013; 2(2): 641-3.

5- Ishita C, Kaushik B, Uday BR. Turmeric and Curcumin Biological Actions and Medicinal Applications. Current Science (serial online) 2004; 87(1): 44-53.

6- Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reprod Biomed Online. 2008; 8(6): 616-27.

7- Daniel S, Limson JL, Dairam A, Watkins GM, Daya S. Through metal binding, curcumin protects against lead- and cadmium–induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and against lead-induced tissue damage in rat brain. J Inorg Biochem 2004; 98(2): 266-75.

8- Jungil H, Mousumi B, Jihyeuny J, Jae-Ha R, Xiaoxin C, Shengmin S. Modulation of Arachiodonic Acid Metabolism by Curcumin and Related B-Diketone Derivatives: Effect on Cytosolic Phospholipase A, Cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. Carcinogensis (serial online) 2004; 25(9): 1671-1679.

9- Chigurupati S, Son TG, Hyun DH, Lathia JD, Mughal MR, Savell J. Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. J Endocrinol 2008; 199(2): 333-41.

10- Gebreegziabher Y, Marcos E, McKinon W, Rogers G. Sperm characteristics of endurance trained cyclists. Int J Sports Med 2004; 25(4): 247-51.

11- John D, Gamble BM. Theory and practice of Histological Techniques. 5th Ed, Edinburgh London NewYork Oxford Philadelphia 2002: 278-312.

12- Lotfi N, Khazaei M, Shariatzadeh SMA, Soleimani-Mehranjani A, Ghanbari A.The Effect of Cannabis sativa Hydroalcoholic Extract on Sperm Parameters and Testis Histology in Rats. Int J Morphol 2013; 31(1): 82-86.

13- Mehrabi nasab E, Khazaei M, Khazaei S. The effect of pentylenetetrazol kindling induced epilepsy on hypogonad hormones and sperm parameters of rats. Arak Medical University Journal 2010; 12(4): 105-12.

14- Abbas AM, Ahmed HG. A case-control study of oral epithelial proliferative markers among Sudanese Toombak dippers using micronuclei assay, argyrophilic nucleolar organizer region, Papanicolaou and crystal violet methods. Rare Tumors 2013; 5(3):e31

15- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. Curt Med Chem 2005; 12(10): 1161-208.

16- Kalpana C, Sudheer AR, Rajasekharan KN, Menon VP. Comparative effects of curcumin and its synthetic analogue on tissue lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity. Singapore Med J 2007; 48(2): 124-130.

17- Rao B, Souflir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. Gamete Res 2009; 24(2): 127-34.

18- Shang YJ, Jin XJ, Shang XL, Tang JJ, Liu GY, Dai F .Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure–activity relationship and influence of microenvironment. Food Chem 2010; 119(4): 1435-42.

19- Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reprod Fertil Dev 1995; 7(4): 659-68.

20- Rossato M, Ion Popa F, Ferigo M, Clari G, Foresta C. Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(2): 984-91.

Effects of Curcumin on Reproductive Parameters in Male Mice

*Mohammad Reza Salahshoor[1], Cyrus Jalili[*1], Mozafar Khazaei[1], Fuzie Khani[2]*

1) Fertility and Infertility Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
2) Department of Anatomy, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

***** ***Corresponding author***: Kermanshah, School of Medicine, Fertility and Infertility Research Center **Email:** cjalili@yahoo.com

Abstract :

Backgrand: Infertility is a health problem that causes adverse effects in personal, social and economic domains. Infertility in males has been associated with sperm dysfunctions such as low sperm count, immaturity, abnormality and lack of motilty. The color of turmeric is because of a substance called curcumin for which some anti-oxidative and anti-inflammatory properties have been identified. Although researchers have reported the anti-oxidant properties of curcumin, its effects on reproductive hormones, epididymis pathway, and sperm count and motility in nicotine-infected rats have not been investigated.

Methodes In this study, various doses of curcumin (10, 30 and 60 mg/kg) were administered intra-peritoneally to male mice for 28 consequent days and reproductive parameters as testosterone hormone, motility, morphology, testis weight and histology were analyzed and compared.

Results: The results indicated that increasing the dose of curcumin significantly increased reproductive indices such as sperm count, motility, testis weight and testosterone hormone in most of the groups ($P \leq 05$).

Conclusions: It seems that curcumin increase the quality and quantity of reproductive indices in male mice.

Keywords: Curcumin, reproductive parameters, Male mice

.