اثرات عقیم سازی عصاره گیاه چریش روی موش صحرائی نر

معصومه محمودی میمند(M.S.)[1]، محسن مروتی(Ph.D.)[2]، محمود قاضی خوانساری(Ph.D.)[3]، بتول نصرالله زاده(Ph.D.)[4]، باقر مینایی(Ph.D.)[5].

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 آفت‌کشهای سنتزی تلاش بر این است تا آفت کشهای بیولوژیک و طبیعی جایگزین آنها گردد. از جمله این موارد استفاده از فرآورده‌های گیاهی است. گونه گیاهی *Azadirachta indica* ـ 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 ۲٤ موش صحرایی نر نژاد (Wistar) ٥-٤ ماهه (با وزن ۲۰۰-۱۵۰ گرم) بصورت تصادفی انتخاب شده و به ٤ گروه شامل ٦ موش تقسیم شدند. به گروه اول آب و به سه گروه دیگر به ترتیب ٥*mg/kg*، ۱٥*mg/kg* و ۲٥*mg/kg* عصاره گیاه چریش(عصاره تجاری Neemazal با مقدار آزادیراکتین ۱٪) به مدت ٦ روز متوالی به روش گاواژ خورانده شد. در روز های 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 بافت شناسی بر روی بیضه آنها انجام شود. سپس حیوانات باقیمانده گروه برای تست باروری در کنار موشهای صحرائی ماده بالغ قرار گرفتند. بعد از مشاهدهٔ تکثیر در حیوانات ماده، این گروهها از مراحل آزمایش خارج شدند. مقادیر MCH، هموگلوبین گروه سوم در مرحله اول (P<۰/۰٥) و مرحله دوم (به ترتیب P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۱) و مقدار گلبولهای سفید گروه سوم در مرحله دوم (P<۰/۰٥) 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 وآزمایش اختلاف معنی‌داری دیده نشد. موشهای ماده مجاور شده با گروهی که ۱٥*mg/kg* عصاره گیاه چریش دریافت کرده بودند پس از گذشت ٦۰ روز زایمان نمودند (دوره بارداری این حیوانات ۲۳-۲۰ روز است). در گروهی که ۲٥*mg/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 اسپرماتوژنز، شامل از بین رفتن اسپرماتوزوئیدها، تولید اسپرم‌های غیرطبیعی و پرخونی بافت بینابینی در برخی توبولهای اسپرم‌ساز بود. لذا با گذشت زمان (۹۰-٦۰ 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.

گل واژگان : چریش(*Azadirachta indica*)، ضد باروری، اسپرماتوژنز، اسپرماتوزوئید، موش صحرایی 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

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

همـواره جونـدگان بعنـوان آفـات کـشاورزی مطـرح می‌باشند. مطالعات زیادی برای یـافتن راه‌هـای مناسـب کنترل آنها صورت گرفته اسـت. در اغلـب مـوارد بـرای کنترل آنها از مواد سنتزی و شیمیایی استفاده می‌شـود، اما طی نیم قرن گذشته استفاده از آفت‌کـشهای سـنتزی اغلب بدون دقت و بی‌رویه بوده که منجـر بـه مـسائل و مشکلات زیست محیطی زیادی از جملـه: آلـودگی مـواد غذایی، خاک، آبهای سطحی و زیرزمینـی، آلـودگی هـوا و... شده است. به این مشکلات میتوان باقیمانده سـموم، عـوارض سـوء بـر حـشرات و سـایر موجـودات زنـده غیرهدف، افزایش تعـداد آفـات مقـاوم بـه آفـت‌کـشها و طغیان مجدد آفات را نیز افزود(۱).

امروزه در تمام کشورها آگاهی افراد نسبت بـه مـسائل زیست محیطـی و اثـرات جـانبی مـرتبط بـا اسـتفاده از آفت‌کشهای سنتزی رو به افزایش است، لذا سعی بر این است تـا بـا جـایگزین کـردن آفـت‌کـشهای بیولوژیـک و طبیعی به جای انواع سنتزی، گامی در جهت حفظ محیط زیست و سـلامت انـسان برداشـته شـود. از جملـه ایـن موارد استفاده از فرآورده‌هـای گیـاهی اسـت کـه بـرای حفاظت گیاهان در مقابل آفات و بیماریها مورد اسـتفاده قرار می‌گیرنـد. یکـی از خـانواده‌هـای گیـاهی کـه دارای ویژگیهای متعدد و از جمله اثر بر آفات و حشرات اسـت خانواده ملیاسه[1] (شال سنجد) می‌باشد. یکی از گونه‌های این خانواده بنام چریش[2] گیاه بومی شـبه قـاره هنـد بـا ویژگیهای دارویی بسیار زیاد بوده که از قرنها پیش در طب سنتی مردم این سرزمین مورد استفاده بوده اسـت. در حال حاضر به علت موارد کاربرد متعدد آن در تمـام مناطق دنیا بعنوان یک درخت اعجاب انگیز مـورد قبـول واقع شده است(۲). ترکیبات مختلف گیاه چـریش سـالها است که مورد شناسائی قرار گرفته است. ایـن ترکیبـات دارای خواص ضد ویروسی، ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضدالتهاب و ضدتب مـی‌باشـند(۵-۳). پلـی‌سـاکاریدهای حاصـل از عـصاره آبـی پوسـت سـاقه درخـت دارای خواص ضـد تومـوری بـوده و باعـث القـای اینترفـرون می‌گردد(٦). در ارتباط با تولید مثل، اثرات ضد بـاروری روغن چریش ابتدا توسط Lal و همکارانش گزارش شـد (۷). عصاره مغز دانه چریش اثرات ضد باروری و سقط جنینی موقت و قابل بازگشتی دارد کـه مطالعـات متعـدد روی حیوانات آزمایشگاهی آنرا به اثبات رسـانده اسـت و در حال حاضر نیز در کـشور هندوسـتان از عـصاره آن جهت ساخت قـرص‌هـای ضـدباروری بـرای انـسان استفاده می‌شود(۸). لذا با توجه به ویژگی‌های این گیـاه، در این تحقیق سعی شده است تا ضمن مطالعه خاصیت ضدباروری دائم عصاره چریش روی موش صـحرایی، میزان دوز مؤثر آن جهت عقـیم سـازی دائـم جونـدگان بررسی شود.

مواد و روشها

بـرای انجـام ایـن مطالعـه ۲٤ مـوش صـحرائی نـژاد Wistarبـا سـن ۵-٤ مـاه و وزن ۲۰۰-۱۵۰ گـرم از بصورت تصادفی انتخاب و به ٤ گروه ٦ عـددی تقـسیم شدند. یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفتـه شـد کـه فقط آب دریافت کردند و سه گروه دیگر، گروههای اول، دوم و سـوم آزمـایش بـه ترتیـب دوزهـای ۵*mg/kg* (۰/۱*ml*)، ۱۵*mg/kg* (۰/۳*ml*) و۲۵*mg/kg*(۰/۵*ml*) عصاره گیـاه چـریش (عـصاره تجـاری Neemazal بامقـدار 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 حجـم مساوی مایع دریافت کردنـد. بـه ایـن ترتیـب کـه گـروه شـاهد: ۰/۵*ml* آب، گـروه اول: آب ۰/٤*ml* همـراه بـا عصاره ۰/۱*ml*، گروه دوم: آب ۰/۲*ml* همراه با عـصاره ۰/۳*ml* و گـروه سـوم: ۰/۵*ml*عـصاره دریافـت کردنـد. گاواژ کردن حیوانات به مدت ٦ روز متوالی انجـام شـد.

1-Meliacea
2-*Azadirachta indica*

Downloaded from http://www.jri.ir

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

فاکتورهای هماتولوژیک	گروههای آزمایشی			
	کنترل	اول (۵ *mg/kg*)	دوم (۱۵ *mg/kg*)	سوم (۲۵ *mg/kg*)
WBC(M/mm^3)	۹/۷٤±۲/٦۲	۱۲/۹۷±۱/٥۹	۸/٦۰±۱/٤۱	۸/۲٥±۱/٤۰
RBC(M/mm^3)	۷/۰۸±۰/۱۷	۷/٦۷±۰/۱۲	۷/٦۱±۰/۱٦	۷/٦٥±۰/۱۸
Hb(*g/dl*)	۱۳/۹۸±۰/٤٥	۱٥/۷٦±۰/۳۹	۱٥/۲۷±۰/۳۹	۱٦/٥۰±۰/۳٤*
MCV(*fl*)	٥۳/۰۸±۰/۷٦	٥۳/۰۰±۱/۰۳	٥۳/۱۱±۰/٥۲	٥٥/۰۰±۱/۰۸
MCH(*Pg*)	۱۹/۷٦±۰/۳٦	۲۰/۰۱±۰/۲۱	۲۰/۰۱±۰/۲٤	۲۱/٥٦±۰/٤۳*
MCHC(*g/dl*)	۳۷/۲۲±۰/۱۹	۳۷/۹۳±۰/۱۱	۳۷/۷۳±۰/۲۳	۳۹/۲۰±۰/٤۰
Hct(%)	۳۷/٦۰±۱/۱۱	٤۰/٤٦±۰/٥۸	٤۰/٤٦±۰/۹۱	٤۲/۰۰±۰/٤۳
Lym(%)	٦۸/٦۰±٦/۸٤	۷۳/۰۸±۲/۲۷	٦۷/۸۷±۲/٦۰	۸۸/۱۰±۲/۷۹

مقادیر جدول M±SD در ٦-٥ موش صحرایی می‌باشند.

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)[1]، خون در ویالهای محتوی یک قطرهEDTA[2] 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)[3]، تعداد گلبولهای قرمز (RBC)[4]، هموگلوبین (Hb)[5]، حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)[6]، مقدار متوسط هموگلوبین سلولی (MCH)[7]، مقدار متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC)[8]، 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 نمونه‌ها با استفاده از کیت تستوسترون (DRG Diagnostics, Germany) و دستگاه الایزا مقدار هورمون سنجش شد.

اندازه‌گیری تستوسترون: ۲٥μl 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[9] با استفاده از ٤۰۰μl محلول شستشوی رقیق سه بار شستشو گردید. ۲۰۰μl محلول سوبسترا به آن اضافه شد و پس از ۱٥ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق واکنش آنزیمی با افزودن ۱۰۰μl محلول اسیدی متوقف گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه الایزا در طول موج ٤٥۰nm قرائت گردیده و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت نمونه‌های مجهول تعیین گردید.

در روز نهم (دو روز پس از پایان گاواژ) 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

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

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول۲- توزیع فاکتورهای هماتولوژیک در گروههای آزمایش و شاهد موشهای صحرایی دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش (مرحله دوم: روز نهم آزمایش)

فاکتورهای هماتولوژیک	گروههای آزمایشی			
	کنترل	اول (۵ *mg/kg*)	دوم (۱۵ *mg/kg*)	سوم (۲۵ *mg/kg*)
WBC(*M/mm3*)	۵/۹٤±۱/۲۰	۹/۹۰±۱/٦۰	۸/۷۸±۰/۷۲	۱۱/۸۷±۱/۳۰*
RBC(*M/mm3*)	۷/۲۰±۰/۱۰	۷/٤٦±۰/۰۸	۷/۳٦±۰/۱۷	۷/٤۳±۰/۱۸
Hb(*g/dl*)	۱۳/۵٦±۰/۳٦	۱٤/۱۵±۰/۲۱	۱٤/۰٦±۰/۳۵	۱۵/۸۷±۰/۲٦**
MCV(*fl*)	۳۵/۸۰±۰/٦۳	۵۳/۱۸±۰/۳۵	۵۲/٦۱±۰/۵٦	۵۵/۳۲±۰/۹٤
MCH(*Pg*)	۱۸/۹۰±۰/٤۷	۱۸/٤۵±۰/٤٤	۱۹/۱۰±۰/۲۰	۲۱/۳۷±۰/۳۰**
MCHC(*g/dl*)	۳۵/۱۰±۰/٦۳	۳۵/٦۲±۰/۳۰	۳۸/۹۰±۰/۲۵	۳۸/٦۷±۰/۲۵
Hct(%)	۳۷/۸٦±۰/٦۳	۳۹/٦۸±۰/۵۸	۳۸/۷۰±۰/٦۸	٤۱/۰۷±۰/٤٤
Lym(%)	۸۳/۱۰±۱/۷٤	۸۳/۳۵±۱/٦۵	۸٤/۷۱±۱/٦۲	۸۵/۸۵±۱/۲۳

مقادیر جدول M±SD در٦-۵ موش صحرایی می‌باشند.

مقادیر فوق از نظر معنی‌دار بودن نسبت به گروه کنترل مقایسه شده‌اند P<۰/۰۵ *، P<۰/۰۱ **.

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 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:

جدول۳- اختلاف میانگین مقادیر عوامل هماتولوژیکی مرحله اول و دوم خونگیری در موشهای صحرائی دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش

فاکتورهای هماتولوژیک	گروههای آزمایشی			
	کنترل	اول (۵ *mg/kg*)	دوم (۱۵ *mg/kg*)	سوم (۲۵ *mg/kg*)
WBC(*M/mm3*)	۳/۷۹	۳/۰۷	۰/۱۷	۳/۵۹
RBC(*M/mm3*)	۰/۱۱	۰/۲۱	۰/۲۵	۰/۲۲
Hb(*g/dl*)	۰/٤۲	۰/۵۹	۱/۲۱	۰/٦۲
MCV(*fl*)	۰/۷۲	۰/٤۵	۰/۵۰	۰/۳۲
MCH(*Pg*)	۰/۸٦	۱/۵٦ *	۰/۹۱	۰/۱۸
MCHC(*g/dl*)	۲/۱۲	۲/۳۱	۱/۱۷	۰/۵۲
Hct(%)	۰/۲٦	۰/۷۷	۱/۷٦	۰/۹۲
Lym(%)	۱٤/۵۰ *	۱۰/۲٦	۱٦/۸٤ *	۲/۲۵

مقادیر جدول مربوط به ٦-۵ موش صحرایی می‌باشد P<۰/۰۵ *.

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول۴- مقادیر هورمون تستوسترون در گروههای آزمایش و شاهد موشهای صحرایی دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش (در مرحله اول و دوم)

زمان بررسی	مقادیر تستوسترون گروههای آزمایش			
	کنترل	اول (۵ mg/kg)	دوم (۱۵ mg/kg)	سوم (۲۵ mg/kg)
مرحله اول	۱/٦٦±۰/۵۵	۰/۹۸±۰/۳۱	۱/۰۵±۰/۱٦	۰/٦۲±۰/۲۰
مرحله دوم	۱/٦٦±۰/۵٤	۱/۸۱±۰/۳۸	۰/۹۸±۰/۲۹	۲/۳۰±۰/٦۸

مقادیر جدول M± SD در٦-۵ موش صحرایی می‌باشند.

آبگیری با استفاده از اتانول، شفاف‌سازی توسط زایلین[1]، 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 سردشدن پارافین، بافت به مقاطعی با ضخامت ۷μ-٦برش داده شد. رنگ‌آمیزی مقاطع با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین صورت گرفت. لام‌ها پس از آماده‌شدن مورد بررسیهای بافت‌شناسی قرار گرفت. برای محاسبه میانگین و انحراف معیار داده‌های انجام شد. P<۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

الف:تأثیر عصاره گیاه چریش 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<۰/۰۵)

جدول۵- توزیع وزن موشهای صحرایی در روزهای مختلف در گروههای آزمایش و کنترل (بر حسب گرم)

زمان خون‌گیری (روز)	میانگین وزن گروههای آزمایش			
	کنترل	اول (۵ mg/kg)	دوم (۱۵ mg/kg)	سوم (۲۵ mg/kg)
اول	۱٦۹/۵۰±۹/۰٤	۱۷۸/٤۳±٦/۱۹	۲۰۰/۸٦±۸/٤۵	۲۰۰/۰۰±۱۰/۲۲
سوم	۱۹۱/۵۰±۸/٤۸	۱۹٤/۰۰±۷/۲۳	۱۹۹/۵۷±۱/٤۱	۲۳۰/٦۰±۱۲/۱۳
پنجم	۱۸۸/۱۷±۹/۵۳	۱۹۰/۲۹±۷/٤۹	۲۰۹/٤۳±۱۱/۹٦	۲۲۷/٤۰±۱۰/٤۷
هشتم	۱۸۵/۸۳±۷/۹۱	۱۹۵/۲۹±۹/۹۷	۱۷٦/٤۳±۱۰/٤۹	۲۳۷/۰۰±۱۵/۳۲

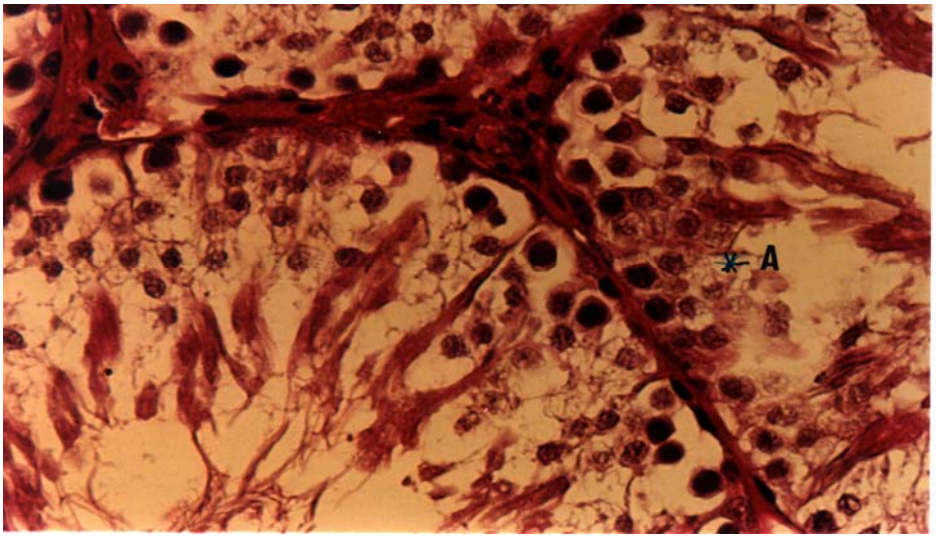
مقادیر جدول M±SD در ٦-۵ موش صحرایی می‌باشند.

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 در حالیکه مقادیر سایر فاکتورها در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد(جدول۱).

بررسی فاکتورهای هماتولوژیک در روز نهم آزمایش (مرحله دوم خونگیری) نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار

1-Xyline

Downloaded from http://www.jri.ir

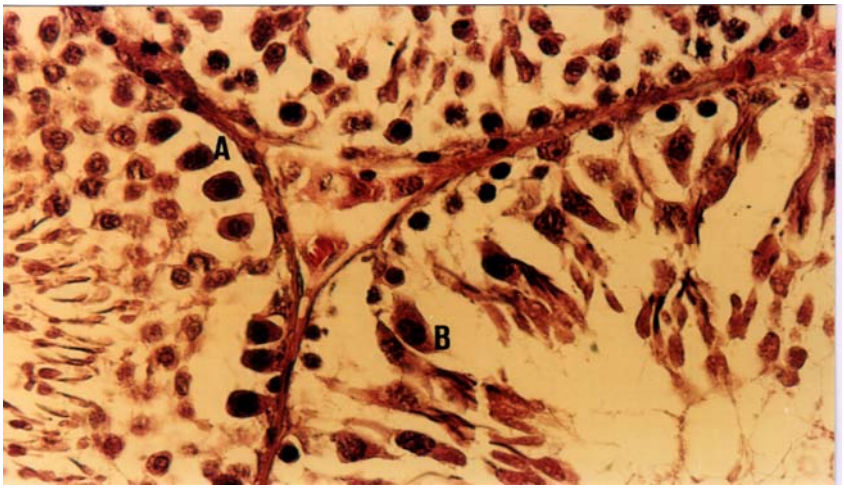


شکل ۱-مقطعی از دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز بیضه موش صحرائی نر دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش (گروه اول آزمایشی)
A: رده‌های مختلف سلولهای اسپرم‌ساز به شکل خوشه‌ای

هموگلوبین، MCH وWBC در گروه سوم نسبت به گروه کنترل است (به ترتیب P<۰/۰۱ ، P<۰/۰۰۱ و P<۰/۰۵). مقادیر سایر فاکتورها در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد (جدول۲). 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<۰/۰۵) (جدول۳).

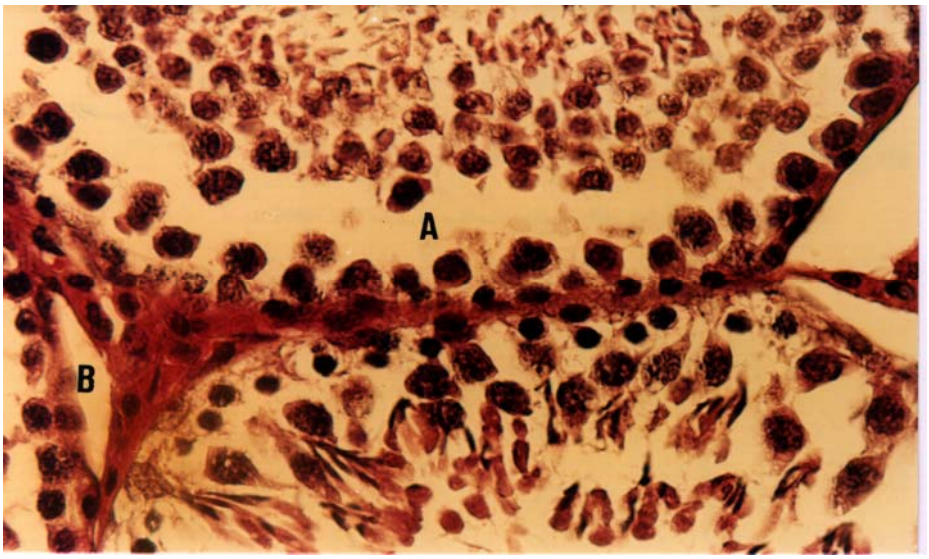
ب-تأثیر عصاره گیاه چریش بر مقدار هورمون تستوسترون: بر اساس مقایسه مقادیر حاصل از اندازه‌گیری مقدار هورمون تستوسترون در گروههای مختلف آزمایش در هیچ یک از گروه‌ها نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(جدول٤).

ج-اثر عصاره گیاه چریش بر وزن: بررسی تغییرات وزنی حیوانات بیانگر این است که در طی مدت آزمایش،



شکل۲-مقطع دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز در بیضه موشهای صحرائی نر(گروه کنترل)
A: گسست لایه اولیه سلولهای مسئول اسپرماتوژنز (اسپرماتوگونی) از جدار لوله‌ها
B: تورم ودفرمه‌شدن سلولها

Downloaded from http://www.jri.ir



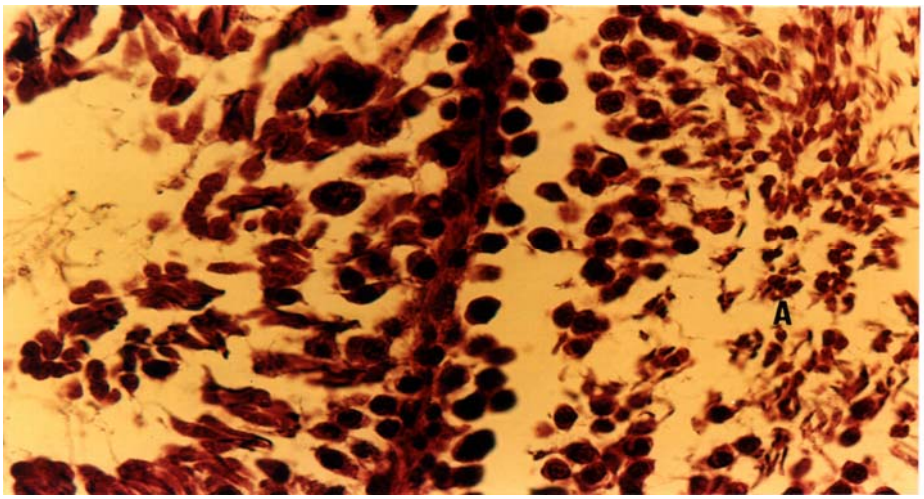
شکل ۳-مقطعی از دیواره‌های مجاری اسپرم‌ساز بیضه موشهای صحرائی دریافت‌کننده عصاره گیاه چریش (گروه دوم آزمایشی)

A: کاهش رده‌های مختلف سلولهای اسپرم‌ساز

B: پرخونی در بافت بینابینی

میانگین وزنی هیچ یک از گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد(جدول۵).

سلولهای اسپرم‌ساز و پرخونی در بافت بینابینی در برخی از مجاری[1] اسپرم‌ساز است که نشان‌دهنده آماس



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

A: از بین رفتن اسپرمها در مرکز مجرای اسپرم‌ساز

د-اثر عصاره گیاه چریش بر بافت بیضه: نتیجه مطالعات بافت‌شناسی بیانگر کاهش رده‌های مختلف در بافت بینابینی می‌باشد (اشکال ۲و۳). هم‌چنین در

1-Tubules

Downloaded from http://www.jri.ir

برخـی مجـاری، اسـپرماتوزوئیدها در مرکـز مجـاری اسپرم‌ساز دچار نکروز گردیده‌اند(شکل٤). گسست لایـهٔ اولیه سلولهای مسئول اسـپرماتوژنز از جـدار لولـه‌هـا، تورم و تغییر شکل سلولها که بیانگر مرگ سلولی اسـت در برخـی مجـاری دیـده مـی‌شـود (شـکل ۲). شـکل ۱، مقطعی از دیواره‌های مجاری اسپرم‌سـاز بیـضه گـروه کنتـرل را نـشان مـی‌دهـد کـه در آن رده‌هـای مختلـف اسپرماتید بـصورت خوشـه‌ای و اسـپرماتوزوئیدها کـه سر آنهـا بـه سـمت محـیط و دم آنهـا بـه سـمت مرکـز مشاهده می‌گردد.

مدت زمان تغییر در قدرت باروری و وقفه در تولید مثل این حیوانات در گروه‌های اول، دوم و سوم آزمایشی به ترتیب ٥٠، ٦٠ و ۹۰ روز بود در حالیکه در گروه کنتـرل پـس از ۲۳ روز (دوره بـارداری مـوش‌هـای صـحرایی) تکثیر دیده شد.

بحث

در این مطالعه اثر عصاره گیـاه چـریش بـر فاکتورهـای هماتولوژیک، هورمون تستوسترون مورد بررسی قـرار گرفت. در حیواناتی که بـه مـدت ٦ روز تحـت تیمـار بـا عـصاره گیـاه چـریش بودنـد، دو مرحلـه خـونگیری در روزهـای چهـارم و نهـم آزمـایش انجـام و فاکتورهـای هماتولوژیک سـنجش شـد. هموگلـوبین و MCH گـروه سوم در هر دو مرحله و WBC گـروه سـوم در مرحلـه دوم نسبت به گـروه کنتـرل اخـتلاف معنـی‌داری نـشان دادنـد(جـداول۳-۱). در مطالعـه انجـام شـده توسـط Parshad و همکاران تجویز دوزهای ۰/۱٪،۰/٤٪ و ۱/٦٪ عصاره آبی چریش به موشهای صحرایی نر به مدت ۱۰ هفته باعث افزایش معنـی‌دار مقـادیر RBC، PCV[1]، Hb، MCHC گروههای آزمایشی نسبت به گروه کنتـرل شـد که این افزایش می‌تواند دلیلی بر وجود برخـی ترکیبـات فعال در عصاره آبی چریش باشـد کـه تولیـد سـلولهای خـونی را تحریـک مـی‌کنـد(۹). از طرفـی طبـق گـزارش Talwar و همکـارانش در سـال ۱۹۹۷ تیمـار موشـهای صحرایی و میمونهای آزمایشگاهی با عـصاره تخلـیص شـده گیـاه چـریش تغییـر چنـدانی در فاکتورهـای هماتولوژیکی ایجاد نکرد(۱۰). تجویز خـوراکی عـصاره چریش به موشهای صحرایی نر و ماده به مدت ۹۰ روز هـیچ تغییـری در مقـدار هموگلـوبین، RBC، WBC، لوکوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌هـا ایجـاد نکـرد (۱۱). در مطالعه حاضـر مقـدار هورمـون تـستوسترون طی دو مرحلـه خـون‌گیـری نیـز اخـتلاف معنـی‌داری را نشان نداد(جدول٤). در مطالعه Parshad مقدار هورمون تستوسترون با افزایش دوز عصاره کـاهش معنـی‌داری نـشان داد ($P<0/01$) کـه ایـن کـاهش را دلیـل احتمـالی کـاهش وزن نـسبی سـمینال وزیکـول‌هـا عنـوان کـرده است(۹). اما مطالعهKrause هیچ اخـتلاف معنـی‌داری را در مقـدار هورمـون تـستوسترون و وزن سـمینال وزیکول‌های حیوانات مـورد آزمـایش نـشان نـداد(۱۲). اختلاف در نتـایج حاصـل از آزمایـشات مختلـف ممکـن است ناشی از تفاوت در روش انجـام آزمـایش از قبیـل نـوع و دوز عـصاره مـصرفی، نحـوه تجـویز عـصاره، تکنیک‌های استخراج، طول دوره درمان و گونه حیوانات مورد آزمایش باشد. بررسی‌های بافـت شناسـی مقـاطع تهیه شده از بیضه حیوانات نشان داد عصاره بر مراحل مختلف اسـپرماتوژنز در لولـه‌هـای اسـپرم‌سـاز تـأثیر گذاشته و سیر طبیعی اسپرماتوژنز را تغییر می‌دهد. این اختلالات به چندین حالت دیـده مـی‌شـود: گسـست لایـه اولیه سلولهای اسپرماتوگونی از جدار لوله‌هـا، تـورم و تغییر شکل این سـلولها و اسپرماتوسـیت‌هـا کـه بیـانگر مـرگ سـلولی اسـت(شـکل۳)، اخـتلال در تولیـد اسپرماتیدها، از بـین رفـتن اسـپرماتوزوئیدها در مرکـز مجاری اسپرم‌ساز(شـکل٤) و کـاهش رده‌هـای مختلـف سـلولهای اسـپرم‌سـاز(اشـکال۲و۳). تغییـرات فـوق در برخی توبولها دیده می‌شود و در کنـار آنهـا توبولهـایی

1-Packed Cell Volume

Downloaded from http://www.jri.ir

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(۱۵-۱۳). مطالعه اثر عصاره برگهای چریش بر بیضه موشهای صحرایی آلبینو توسط Shaikh، بیانگر ایجاد ضایعه درسلولهای لیدیگ 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 وزیکول سمینال و بخش ونترال[1] پروستات در اثر تیمار با عصاره برگ چریش شاهدی 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 ٦ 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 Reaserch, 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

Downloaded from http://www.jri.ir

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 f 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 Rauischholzhausen 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. Genotoxity of a crude leaf extract of neem in male germ cells of mice. Cytobios. 2001; 106: 151- 64.

Downloaded from http://www.jri.ir