

Study of the effects of aqueous extract of *Anacyclus pyrethrum* on seminiferous tubules in rat testis

Maryam Arab¹, Mohammad Reza Arab², Mohammad Reza Shahraki³, Narjes Sargolzaei⁴, Sariyeh Shahraki⁵, Fereydoon Sargolzaei-Aval⁶, Mohammad Rigi-Manesh⁷, Sima Tavakolinejad⁷

Extract of *Anacyclus Pyrethrum* contains materials which the potential to affect the tissues of the testis. The aim of the present study was to identify the histological effects of aqueous extract of AP on Rat testis. In this experimental study 48 adult male Wister rats were chosen and divided into experimental (36 rats) and control (12 rats) groups. The rats in the experimental group were divided into three subgroups, one, two and three, and each subgroup received 50, 100 and 150 mg/kg doses of the extract intraperitoneally for four weeks, respectively. The rats were then placed under deep anesthesia and samples were collected from their testicles and paraffin blocks were prepared. Histological sections with 6 µm thickness were prepared and stained with H&E method and variables (internal and external and thickness of germinal epithelium) were measured in at least in 100 somniferous tubules in each rat. Statistical analysis showed that there was a significant difference between control and experimental groups and for external and internal diameters ($p < 0.002$). Although there was no any significant difference for an epithelial thickness between control and experimental 50 mg/kg, there was a significant difference between control and other experimental groups ($p < 0.002$). It seems that aqueous extract of *Anacyclus pyrethrum* could change epithelial thickness, internal and external diameters of seminiferous tubule Rat testis.

Key Words: Spermatogenesis; Extract; *Anacyclus Pyrethrum*; Rat.

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2018; 25(4): 342-348.

Received: January 16, 2018

Accepted: May 19, 2018

¹ General practitioner, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

² **Corresponding author;** Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

Tel: +9854-33295715 Fax: +9854-33295728 E-mail: mr_arabz@yahoo.com

³ Department of Physiology, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

⁴ Department of Community Medicine, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

⁵ Department of Physiology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.

⁷ School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

⁶ Cellular and Molecular Research Center, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

⁷ School of Medicine, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

مطالعه اثرات عصاره آبی گیاه عاقرقرا (*Anacyclus Pyrethrum*) بر لوله‌های منی‌ساز در موش صحرائی

مریم عرب^۱، محمدرضا عرب^۲، محمدرضا شهرکی^۳، نرجس سرگلزایی^۴، ثاریه شهرکی^۵،
فریدون سرگلزایی اول^۶، محمد ریگی منش^۷، سیما توکلی نژاد^۷

چکیده

عصاره گیاه عاقرقرا، حاوی ترکیباتی است که می‌تواند بافت بیضه را تحت تأثیر قرار دهد. هدف از این مطالعه، شناسایی اثرات بافتی عصاره ریشه گیاه عاقرقرا در بیضه موش صحرائی بود. در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۸ موش صحرائی نر و بالغ در قالب دو گروه شاهد (۱۲ سر) و آزمایش (۳۶ سر) مورد بررسی قرار گرفتند. رت‌های گروه آزمایش، به سه زیرگروه یک، دو و سه تقسیم شدند و هر زیرگروه به ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/kg از عصاره را به صورت داخل صفاقی به مدت چهار هفته دریافت کردند. سپس موش‌ها تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند و نمونه برداری از بیضه آنها انجام و بلوک‌های پارافینی از آن تهیه گردید. از بلوک‌های پارافینی تهیه شده، مقاطعی با ضخامت ۶ میکرومتر تهیه و با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی گردید. در نهایت در هر رت حداقل ۱۰۰ لوله منی‌ساز مطالعه و متغیرهای قطر داخلی و خارجی و ضخامت پوشش ژرمینال اندازه‌گیری شد. قطر خارجی و داخلی لوله‌های منی‌ساز در موش‌های هر سه زیرگروه آزمایش نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.002$)؛ اما اختلاف ضخامت پوشش ژرمینال بین گروه شاهد با گروه آزمایش دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg از عصاره معنی‌دار نبود؛ در حالی که این اختلاف بین گروه شاهد با دیگر گروه‌های آزمایش معنی‌دار بود ($P < 0.002$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره ریشه گیاه عاقرقرا می‌تواند باعث تغییرات ساختاری در پوشش ژرمینال در بیضه گردد.

واژه‌های کلیدی: اسپرمتوژنز؛ عصاره؛ عاقرقرا؛ موش صحرائی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۷؛ ۲۵(۴): ۳۴۲-۳۴۸.

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۹

۱ پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۲ نویسنده مسؤول؛ عضو مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

آدرس: زاهدان - دانشگاه علوم پزشکی زاهدان - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریحی.

تلفن: ۰۹۱۵۳۴۱۴۳۵۴؛ شماره: ۰۵۴۳۳۲۹۵۷۲۸؛ پست الکترونیکی: mr_arabz@yahoo.com

۳ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۴ گروه پزشکی - اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۵ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران.

۶ عضو مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۷ گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

مقدمه

گنادوتروپین‌ها را افزایش دهد. این عصاره حاوی ترکیبی به نام آناسایکلین و آلکیل‌امید نیز است (۷). اپی‌تلیوم ژرمنال مفروش‌کننده لوله‌های منی، پوشش مطبّق کاذبی است که با مجموعه‌ای از سلول‌های رده اسپرماتوزوئیدی و سرتولی آنچنان ارتباطات پیچیده‌ای میان خود به‌وجود می‌آورند که ضمن تقسیمات سلولی مورد نیاز برای تولید اسپرماتوزوئید و تمایزات سلولی مسئول تولید گامت نر، امکان حفظ جمعیت سلولی اسپرماتوگونیاها در تمام طول عمر برای مردان را فراهم می‌کنند. به‌دلیل ارتباطات بین این دو رده سلولی، گنادوتوکسین‌ها می‌توانند با تغییر ساختمان این پوشش مطبّق کاذب، تغییرات زیادی را در کیفیت و کمیّت مایع منی ایجاد نمایند (۸). از آنجا که بنا به توصیه سازمان بهداشت جهانی، اقبال به گیاهان دارویی برای درمان مسائل مربوط به اختلالات جنسی افزایش یافته است، هدف از این مطالعه، تعیین تأثیر بافتی عصاره آبی گیاه عاقرقرا بر روند اسپرماتوزنز در بیضه موش صحرایی بود.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۸ سر موش صحرایی نر بالغ با وزن 10 ± 200 گرم، در قالب دو گروه شاهد (۱۲ سر) و آزمایش (۳۶ سر) مورد بررسی قرار گرفتند. رت‌ها در شرایط مشابه و استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، رطوبت ۴۵-۵۰ درصد، تهویه مناسب و درجه حرارت ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و دسترسی آزاد به آب و مواد غذایی داشتند.

ابتدا ریشه گیاه عاقرقرا از یک فروشگاه محلی در شهر زاهدان خریداری و توسط کارشناس هرباریوم دانشگاه سیستان و بلوچستان شناسایی و تأیید گردید. برای عصاره‌گیری، ابتدا ریشه‌های خشک‌شده گیاه در ظرفی ریخته شد و به آن آب مقطر اضافه گردید؛ سپس محلول حاوی مواد در دستگاه سوکسله قرار گرفت و عمل عصاره‌گیری به‌مدت ۲۴ ساعت تداوم یافت. پس از این مدت، عصاره گیاهی

ناباروری یکی از مشکلات پیچیده دنیای صنعتی و مدرن امروزه است که خانواده‌های زیادی از آن رنج می‌برند. تقریباً در ۳۰ درصد موارد ناباروری، علت این پدیده، مسائل و مشکلاتی است که به نوعی به مردان مربوط می‌باشد (۱). مطالعات نشان داده است که فاکتورهای متعددی مسؤول ایجاد این مشکلات در مردان است که می‌توان به مواردی همچون درمان‌های دارویی، شیمی‌درمانی، توکسین‌ها و آلاینده‌های محیط زیستی و محیط کار اشاره کرد (۲). با وجود استفاده از داروهای با خاصیت آندروژنی برای درمان مسائل ناباروری در مردان، امروزه استفاده از گیاهان دارویی برای حل مسائل ناباروری مورد توجه محققین فراوانی قرار گرفته است. سازمان بهداشت جهانی استفاده از داروهای گیاهی را به‌دلیل سودمندی‌های فراوان آن مورد تأیید قرار داده است (۳).

گیاه عاقرقرا (*Anacyclus Pyrethrum*) که در طب سنتی هندی از جایگاه ویژه‌ای به‌خاطر خواص جوان‌سازی و افزایش قوای جنسی و جسمی برخوردار است و در زبان محلی به نام آکارکارا شناخته می‌شود، علاوه بر خواص بیان‌شده دارای قابلیت تقویت سیستم ایمنی، خاصیت ضدّ دردی و افزایش‌دهنده مایع بزاق نیز می‌باشد. ریشه این گیاه با توجه به قابلیت دسترسی آسان و قیمت مناسب مورد توجه زیاد قرار گرفته است (۴). مطالعات نشان داده است که عصاره گیاه عاقرقرا می‌تواند میزان جریان خون در اندام‌های جنسی از جمله بیضه و مجاری ناقل اسپرماتوزوئید را افزایش دهد (۵). به نظر می‌رسد ترکیبات موجود در عصاره این گیاه می‌تواند با تحریک سلول‌های گنادوتروپینی موجب افزایش سطح سرمی FSH و LH گردد؛ این موضوع که آیا این امر می‌تواند موجب تغییر پارامترهای مایع سمن گردد، هنوز به خوبی مشخص نیست (۶).

مطالعه شهرکی و همکاران نشان داده است که تجویز عصاره ریشه این گیاه می‌تواند سطح سرمی تستوسترون و

گردید. برای تحلیل نتایج آماری از شاخص‌های تمایل به مرکز برای تمام متغیرها استفاده گردید؛ همچنین از نرم‌افزار آماری SPSS (ویرایش ۲۰) و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی Dunnett T3 استفاده شد. لازم به ذکر است پروتکل کار در این مطالعه، توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زاهدان با کد IR.ZAUMS.REC. 1396-105 تأیید گردید.

یافته‌ها

نتایج تجزیه و تحلیل‌های آماری با آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی Dunnett T3 نشان داد که اختلاف قطر خارجی و قطر داخلی لوله‌های منی‌ساز برای گروه شاهد با تمام گروه‌های آزمایش معنی‌دار بود (به ترتیب با: $P < 0.002$ و $P < 0.02$). نتایج تحلیل‌های آماری با همین آزمون نشان داد که متغیر ضخامت پوشش ژرمنیال، بین گروه شاهد و زیرگروه آزمایشی دریافت‌کننده 50 mg/kg از عصاره، اختلاف معنی‌داری نداشت؛ در حالی که این اختلاف بین گروه شاهد با دو زیرگروه آزمایشی دریافت‌کننده دوزهای 100 mg/kg و 150 mg/kg از عصاره، معنی‌دار بود ($P < 0.002$) (جدول ۱).

به دست آمده، توسط کاغذ صافی و قیف بوختر و در دمای 37°C سانتری‌گراد تهیه و خشک شد. از این عصاره خشک‌شده، غلظت مناسب تهیه و هر بار نیم میلی‌لیتر به رت‌های گروه آزمایش تزریق شد (۱۲).

موش‌های گروه آزمایش، به ۳ زیرگروه یک، دو و سه (هر زیرگروه ۱۲ سر) تقسیم شدند و هر زیرگروه به ترتیب دوزهای 50 mg/kg ، 100 mg/kg و 150 mg/kg از عصاره گیاه عاقرقرحا را به مدت ۴ هفته و به‌طور روزانه به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. پس از پایان دوره مطالعه و توزین مجدد رت‌ها، حیوانات آزمایشگاهی تحت بیهوشی عمیق کشته شدند و بیضه آنها برداشته و مطابق با روش‌های معمول در بافت‌شناسی، تثبیت و آنگیری شد و قالب‌های پارافینی از آن آماده گردید؛ سپس برش‌هایی به ضخامت $6 \mu\text{m}$ میکرومتر تهیه و با روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شد. در نهایت، اندازه قطر داخلی و قطر خارجی و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمنیال، حداقل در ۱۰۰ لوله منی‌ساز برای هر رت در هر گروه اندازه‌گیری شد و با میکروسکوپ دیجیتال لایکا عکس‌برداری گردید. برای محاسبه ضریب اسپرما‌توزن، نسبت درصدی از لوله‌های منی‌ساز که حاوی اسپرم بالغ بودند، در صد لوله منی‌ساز محاسبه شد.

یافته‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار و نیز میانه ارائه

جدول ۱- مقایسه متوسط و میانه اقطار داخلی و خارجی و ضخامت اپی‌تلیوم ژرمنیال (بر حسب میکرومتر) بین گروه‌های شاهد و آزمایش پس از تزریق درون صفاقی عصاره ریشه گیاه عاقرقرحا

متغیر	گروه			شاهد	سطح معنی‌داری
	گروه 50 mg/kg	گروه 100 mg/kg	گروه 150 mg/kg		
متوسط قطر خارجی	$295 \pm 48 / 75$	$301 / 25 \pm 39 / 75$	$295 / 75 \pm 40 / 5$	$280 / 25 \pm 49 / 5$	$P < 0.002^*$
میانه	۳۰۰	۳۰۰	۲۹۵	۲۸۰	---
متوسط قطر داخلی	151 ± 42	$138 / 25 \pm 32 / 5$	$144 \pm 32 / 75$	$133 / 75 \pm 40$	$P < 0.002^*$
میانه	۱۵۰	۱۳۷/۵	۱۴۵	۱۳۲/۵	---
متوسط ضخامت پوشش	$72 / 5 \pm 14 / 75$	$81 / 5 \pm 10$	$76 / 75 \pm 8 / 75$	$73 / 25 \pm 10 / 75$	$P < 0.002^*$
میانه	۷۲/۵	۸۸	۷۵	۷۵	---

* $P < 0.05$ معنی‌دار است

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره آبی ریشه گیاه عاقرقرا، قادر به تغییر هیستولوژی لوله‌های منی‌ساز در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد است؛ آنچنان که تزریق غلظت‌های ۵۰ mg/kg، ۱۰۰ mg/kg و ۱۵۰ mg/kg از عصاره ریشه این گیاه می‌تواند قطر داخلی و خارجی لوله‌های منی‌ساز و همچنین ضخامت پوشش ژرمینال را به‌طور معنی‌داری بین گروه‌های آزمایش و شاهد تغییر دهد.

مطالعات، تأثیر تروفیک عصاره گیاه عاقرقرا را بر اندام‌های تناسلی مثل کیسه‌های منی نشان داده است. همچنین مطالعه Usmani و همکاران نشان داد، عصاره آبی ریشه این گیاه قادر به افزایش معنی‌دار در میزان فروکتوز مایع منی در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد است (۹). بعلاوه مطالعه Thakur و همکاران نشان داد که ترکیبات موجود در عصاره این گیاه قادر به بهبود عملکرد جنسی برای تمام پارامترهای فیزیولوژیک دستگاه تناسلی مردانه می‌باشد؛ آنچنان که Penile Erection Index (PEI) در گروه آزمایشی دریافت‌کننده عصاره تقریباً دو برابر گروه شاهد می‌گردد؛ همچنین این مطالعه نشان داد که بهبود تمام این پارامترها به‌صورت وابسته به دوز در گروه آزمایش می‌باشد (۱۰). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تغییرات ضخامت پوشش ژرمینال به‌عنوان نماینده روند اسپرماتوزن در بیضه‌ها تحت تأثیر ترکیبات عصاره قرار می‌گیرد. آنالیزهای آماری برای این متغیر نشان داد که این اختلاف ضخامت بین گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی با هم معنی‌دار بود.

همچنین نشان داده شده است که میزان ناباروری روز به روز در حال افزایش است و این پدیده معمولاً به‌صورت کاهش تعداد اسپرم‌ها به‌عنوان علت اصلی ناباروری، خود را نشان می‌دهد. گزارشات، کاهش یک‌درصدی تعداد اسپرم‌ها در مایع منی مردان را در طی پنجاه سال اخیر نشان داده است. برای باروری طبیعی علاوه بر تعداد اسپرماتوزوئیدها، قابلیت حرکت و موفولوژی طبیعی آنها نیز مد نظر قرار

می‌گیرد. استفاده از داروها و ترکیبات گیاهی و تکنیک‌های جراحی، از اقدامات پزشکی معمول برای اصلاح ناباروری محسوب می‌شوند. استفاده از عصاره‌های گیاهی نیز برای درمان این اختلالات از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (۶). مطالعات جدید نشان داده‌اند که حفظ ارتباطات سه‌بعدی بین سلول‌ها در پوشش ژرمینال و ارتباط لوله‌های منی‌ساز در این ساختار سه‌بعدی با بافت بینابینی بیضه، از اهمیت زیادی برای حفظ ویژگی‌های اندوکرینی سلول‌های لیدینگ و توان تقسیمی سلول‌های رده اسپرماتوزوئیدی برخوردار است (۵). مطالعه حاضر نشان داد که عصاره این گیاه قادر به حفظ این ساختمان‌های سه‌بعدی در لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی بیضه است.

نتایج مطالعه شهرکی و همکاران (۲۰۰۴) نشان داد که عصاره این گیاه قادر به افزایش میزان گنادوتروپین‌ها، افزایش تستوسترون و تعداد اسپرماتوزوئیدها به‌صورت معنی‌داری در گروه آزمایش نسبت به شاهد است (۶، ۳). نتایج مطالعه حاضر برای گروه‌های شاهد و آزمایش نشان داد که در مقایسه گروه شاهد با گروه‌های سه‌گانه آزمایش، از نظر عروق تستیکولار و بافت بینابینی نیز هیچ‌گونه یافته پاتولوژیک خاصی که حکایت از تأثیر نامناسب عصاره گیاهی عاقرقرا بر بافت بیضه باشد، دیده نشد. این مطالعه از نظر الگوی رنگ‌آمیزی برای اپیتلیوم ژرمینال، غشای پایه، تونیکا آلبوژینه آ و تونیکا و اسکولوزا بین گروه شاهد و گروه‌های سه‌گانه آزمایش نیز تفاوتی نشان نداد. به نظر می‌رسد ترکیبات فعال موجود در عصاره آبی گیاه عاقرقرا، قادر به تغییر هیستولوژی لوله‌های منی‌ساز و بافت بینابینی به‌صورتی که به‌نفع پارامترهای اسپرموگرام هستند می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد عصاره آبی گیاه عاقرقرا قادر به تغییر ضخامت لوله‌های منی‌ساز بوده و این تغییرات هیچ‌گونه آثار توکسیکی را در بیضه ایجاد نمی‌کنند.

تقدیر و تشکر**تضاد منافع**

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی زاهدان و نیز از پرسنل مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی کمال تشکر را دارند. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

- 1- Zegers F, Hochschild JE, Schwarze V, Alam F. Infertility international encyclopedia of public health. New York, Academic press; 2008.
- 2- Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl*. 1993; 16(1): 1-13.
- 3 - Shahraki MR, Shahraki S, Arab MR, Shahrakipour M. The Effects of Aqueous Extract of Anacyclus Pyrethrum on Sperm Count and Reproductive Organs in Adult Male Rats. *Zahedan J Res Med Sci*. 2015; 17(2):42-47.
- 4- El-Kholy WM, Hamieda FAE, El-Zarif NA. Protective effects of aqueous extract of Anacyclus pyrethrum on atrazine induced male reproductive disorders in Rat. *Int J Adv Res*. 2015; 3(10): 1701-15.
- 5- Sharma V, Thakur M, Chauhan N S, Dixit V K. Evaluation of the anabolic , aphrodisiac and reproductive activity of anacylus pyrethrum DC in male rats. *Sci Pharm*. 2009; 77: 97-110.
- 6- Sharma V, Boonen J, Spiegeleer BD, Dixit VK. Androgenic and spermatogenic activity of alkylamide-rich ethanol solution extract of Anacyclus pyrethrum DC. *Phytother Res*. 2013; 27(1): 99-106.
- 7- Shahraki S, Sharifi Rad J, Mohammadzadeh Rostami F, Shahraki MR, Arab MR. Effects of Aqueous Root Extracts of Anacyclus pyrethrum on Gonadotropins and Testosterone Serum in Adult Male Rats. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 2014; 2(6):767-72.
- 8- Pendegraft S S, Sadri- Ardekani H, Atala A, Bishop CE. Three-dimensional testicular organoid: a novel tool for the study of human spermatogenesis and gonadotoxicity in vitro. *Biol Reprod*. 2017; 96(3): 720-32.
- 9- Usmani A, Khushtar M, Arif M, Siddiqui MA, Sing SP, Mujahid M. Pharmacognostic and phytopharmacology study of Anacyclus pyrethrum: An insight. *J Appl Pharm Aci*. 2016; 6(3): 144-50.
- 10- Thakur M, Thompson D, Connellan P, Deseo MA, Morris C, Dixit VK. Improvement of penile erection, sperm count and seminal fructose levels in vivo and nitric oxide release in vitro by ayurvedic herbs. *Andrologia*. 2011; 43(4): 273-7.