تأثیر عصاره گیاه پنج انگشت (Vitex Agnus.Castus) بر غلظت سرمی کورتیزول، پروژسترون و هورمون لوتئینه کننده (LH) در گاوهای شیری

مهران فرهودی‌مقدم[1*]، سیدمحمدعلی خلفی[2]

چکیده

گیاه پنج انگشت (Vitex agnus-castus L.) از بین گیاهان دارویی، گیاهی با اثرات تولید مثلی کاملا شناخته شده است. در مطالعه حاضر، عصاره گیاه با نام تجاری ویتاگنوس، به صورت خوراکی به گاوهای ماده نژاد هلشتاین سیکلیک تجویز شد. ابتدا گاوها به دو گروه تیمار (۷ راس) و شاهد (۷ راس) تقسیم و با تزریق پروستاگلاندین (αPGF2) به فاصله ۱۱ روز همزمانی چرخه تولید مثلی انجام شد و پس از طی یک چرخه با شروع چرخه جدید، خوراندن ۵۰ میلی‌لیتر عصاره گیاهی ویتکس آگنوس (۹۰-۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به گروه تیمار انجام پذیرفت و گاوها مجددا همزمان شده و خوراندن دارو تا پایان چرخه ادامه یافت. گاوها در روزهای ۵، ۹، ۱۳ و ۱۸ چرخه مورد معاینه قرارگرفتند (لمس مقعدی و سونوگرافی)، همچنین بطور روزانه خونگیری صورت گرفت و میزان غلظت کورتیزول، پروژسترون و LH تعیین شد. غلظت کورتیزول سرم در گروه تیمار پس از درمان نسبت به قبل از درمان روند کاهشی داشته است (P> ۰/۰۵). اختلاف در میزان پروژسترون سرم خون در گروه تیمار پس از درمان نسبت به قبل از درمان در روزهای ۱۳ و ۱۸ چرخه روندی افزایشی داشته، همچنین غلظت پروژسترون در روزهای مختلف چرخه در گروه تیمار نسبت به شاهد روندی افزایشی داشته است. مقایسه دقیق نشان می‌دهد که میانگین غلظت LH سرمی در گروه تیمار بعد از درمان نسبت به قبل آن تنها در روز ۱۳ چرخه افزایش یافته است. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می‌رسد که احتمالا عصاره گیاه ویتکس آگنوس می‌تواند بر کاهش کورتیزول و افزایش پروژسترون در سرم خون گاو اثر داشته باشد.

واژگان کلیدی: *گیاه پنج انگشت، پروژسترون، کورتیزول، LH، گاو شیری.*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۹

مقدمه

از دیر باز خواص گیاهان دارویی برای انسان‌ها شناخته شده و با توجه به تنوع آب و هوایی کشور کشت انواع گیاهان دارویی و معطر در آداب و رسوم ایرانیان سابقه‌ای بس طولانی دارد. در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی مورد توجه جدی دامپزشکان در سراسر جهان قرار گرفته است. به خصوص در شرایطی که تولید محصولات ارگانیک و به دور از مواد شیمیایی طرفداران زیادی پیدا کرده. در حال حاضر جایگزینی گیاهان دارویی به جای داروهای سنتتیک در درمان بیماری‌های انسان در حال پیشرفت می‌باشد. اما متأسفانه در زمینه کاربرد گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها در دامپزشکی و صنعت دامپروری مطالعات کمتری صورت گرفته است. بنابراین با توجه به دیدگاه‌های یاد شده توجه بیش از پیش محققان، مسئولان و سرمایه‌گذاری اصولی در این زمینه احساس می‌گردد.

گیاه پنج انگشت *(Vitex agnus-castus)* تقریبا از ۲۵۰۰ سال پیش تاکنون، از بین گیاهان دارویی، گیاهی کاملا شناخته شده است. سال‌های متمادی عصاره برگ و میوه این گیاه در تعدیل اختلالات غدد درون ریز همچون افزایش پرولاکتین خون، اختلالات قاعدگی و یائسگی و ناباروری در خانم‌ها تجویز می‌گردد. در دامپزشکی نیز از عصاره گیاه به دلیل داشتن خواص دوپامینرژیک، در درمان سندرم کوشینگ اسب در کشورهای اروپایی و امریکا استفاده می‌شود(٤). گیاه پنج انگشت درختچه‌ای است با برگ‌های معطر، دانه‌های آن نیز کمی تند و معطر است(۱). مکانیسم اثر گیاه پنج انگشت به طور قطعی شناسایی نشده است اما عقیده براین است که این گیاه از طریق اثر بر محور هیپوتالاموسی ـ هیپوفیزی عمل می‌کند. اکثر مکانیسم‌های مطالعه شده گیاه ویتکس در ارتباط با واکنش آن باگیرنده‌های دو پامینی در هیپوفیز قدامی است. گیاه ویتکس آگنوس ـ کاستوس جهت تنظیم قاعدگی در زنان مبتلا به چرخه‌های قاعدگی کوتاه، بلند یا کم خصوصا در زنانی که

[*]۱- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران (m_farhoodimog@yahoo.com)

۲- دانش آموخته دکترای تخصصی مامایی و بیماری‌های تولید مثل دام، دانشکده علوم دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

میزان پایین پروژسترون و اختلالات فاز لوتئال مورد شک است به کار برده می‌شود(۱۲). هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی تاثیر عصاره گیاه پنج انگشت بر میزان غلظت هورمون‌های کورتیزول، پروژسترون و LH در سرم خون گاوهای شیری می‌باشد.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر در ابتدای مهر ماه در یکی از گاوداری‌های اطراف تهران آغاز و در بهمن همان سال به اتمام رسید. سیستم نگهداری دام در این گاوداری بصورت آزادانه (free-stall) بود. پیش از شروع مطالعه، دفاتر ثبت مشخصات گاوداری بررسی و ۱٤ راس گاو شیری غیر آبستن با روزهای شیردهی ٦۰ تا ۱۰۰ روز انتخاب شدند. این گاوها سابقه بیماری‌های تولید مثلی و سایر بیماری‌ها را نداشتند و مطابق با اطلاعات ثبت شده نظیر تعداد زایش و وضعیت بدنی (۳/۵ تا۲/۷۵=BCS) به ۲ گروه ۷ رأسی تقسیم و سعی شد هر دوگروه ازنظر تمام خصوصیات (تنوع نوبت زایش، تولید شیر و BCS) باهم مشابه باشند. در نهایت به صورت تصادفی گاوها در دو گروه تیمار و درمانی قرار گرفتند.

در طی مطالعه به صورت دوره‌ای و در روزهای ۵، ۹، ۱۳ و ۱۸ طول چرخه جنسی اولتراسونوگرافی بادستگاه Falco 100 از رحم و تخمدان‌ها صورت گرفته و تصاویر تخمدان‌ها ضبط می‌شد. عصاره گیاه از شرکت داروسازی پورسینا تولید کننده داروی گیاهی ویتاگنوس تهیه شد. عصاره هیدروالکی فوق حاوی ۸۰-۹۰ میلی‌گرم عصاره میوه گیاه ویتکس در هر میلی‌لیتر است. به هر راس گاو در گروه تیمار ^{cc}۵۰ عصاره که در ^{cc}۵۰۰ آب سالم و بهداشتی رقیق شده بود روزانه در نوبت صبح و به صورت خوراکی تجویز شد.

۱ـ خون‌گیری جهت تهیه سرم برای تعیین میزان هورمون‌های جنسی

خونگیری با سر سوزن ونوجکت و لوله‌های خلاء دار ساده از سیاهرگ دمی در تمام گاوها در ساعت ۱۰ الی ۱۲ صبح صورت گرفته سپس لوله حاوی خون در جا لوله‌ای قرار داده شد و به مدت حداقل ۱ ساعت در دمای محیط قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ قرار داده می شدند و پس از آن سرم خون جدا شده با استفاده از میکروپیپت جمع‌آوری و در لوله‌های گاما تیوب ریخته و تا روز انجام آزمایش در دمای ^{0C}۲۰- در فریزر نگهداری شدند.

۲ـ اندازه‌گیری هورمون کورتیزول

جهت تعیین میزان غلظت هورمون کورتیزول ازکیت الایزا DRG-diagnostics ساخت کشور آلمان استفاده شد. مراحل انجام آزمایش به شرح زیر بود:

ابتدا ۲۰ میکرولیتر از نمونه را داخل هر خانه ریخته و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از آنزیم کونژوگه را به هر خانه اضافه نمودیم و روی خانه‌ها با فویل پوشانده و بمدت ۱۰ ثانیه تکان داده شد. سپس بمدت ٦۰ دقیقه در دمای اتاق (room temperature) قرار داده، محلول کشت شده را سه بار با بافر شستشو دهنده به میزان ۳۰۰ میکرولیتر شستشو داده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترا به هر خانه اضافه گردید و پس از ۱۵ دقیقه، ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول متوقف کننده اضافه شده، به آرامی تکان داده تا رنگ آبی محلول به رنگ زرد تغییر یافت. و در این مرحله با استفاده از فوتومتر چگالی نوری را اندازه‌گیری کرده و با استفاده از منحنی استاندار غلظت هورمون تعیین شد.

۳ـ اندازه‌گیری هورمون LH

جهت تعیین میزان غلظت هورمون LH از کیت الایزا اختصاصی گاو $^{®}$LH DETECT ساخت کشور فرانسه استفاده شد که یک آزمایش ایمنی-آنزیمی مدل ساندویچی میباشد. ابتدا بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق، میکروپلیت را به دمای مورد نظر رسانده سپس نمونه ها، به نسبت ۱ به ده با استفاده از محلول رقیق کننده (۹۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده + ۱۰ میکرولیتر از نمونه)، رقیق شده و در داخل خانه‌های پلیت ریخته و روی خانه‌ها را با نوار چسب پوشانده و به آرامی تکان داده و بمدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. هر ۱۵ دقیقه یکبار پلیت‌ها را تکان داده شد تا بخوبی ترکیب شوند. پس از انجام مراحل فوق خانه‌ها را خالی کرده و مرحله شستشو آغاز

می‌گردد و سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوکه AC2 به خانه‌ها اضافه شد و پس از طی یک ساعت در دمای اتاق مجدداً شستشو انجام پذیرفت و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوکه AC3 به خانه‌ها اضافه کردیم و همانند مراحل قبلی در دمای اتاق انکوبه و سپس شستشو صورت گرفته و در نهایت با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا پس از طی ۱۵ دقیقه واکنش رنگ سبز در داخل خانه‌ها قابل مشاهده بود که اندازه گیری با اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٥٠nm انجام و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت هورمون محاسبه گردید.

٤ـ اندازه گیری هورمون پروژسترون

جهت تعیین میزان غلظت هورمون پروژسترون از کیت الایزا PROGESTERONE ELISA KIT (55R--RRE52231)® ساخت کشور آلمان استفاده شد.مراحل انجام آزمایش به شرح زیر می‌باشد:

ابتدا ۲۵ میکرولیتر از نمونه را داخل هر خانه ریخته، سپس بمدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بعد از آن ۲۰ میکرولیتر از آنزیم کونژوگه به هر خانه اضافه شد و بمدت ۱۰ ثانیه تکان داده و پس از طی ٦۰ دقیقه شستشو صورت گرفت (سه بار و به ازای هر خانه ٤۰۰ میکرولیتر) پس از شستشو ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا به هرخانه اضافه شد و پس از سپری شدن ۱۵ دقیقه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده به هر خانه اضافه شد و بعد از ۱۰ دقیقه با استفاده از فوتومتر با طول موج ٤۵۰ نانومتر قدرت جذب سنجیده و بر اساس منحنی استاندارد غلظت هورمون تعیین شد.

۵ـ روش کلی انجام مطالعه در گروه‌های تیمار و شاهد

پیش از شروع مطالعه ١٤ راس گاو شیری غیر آبستن انتخاب و به دو گروه ۷ رأسی تقسیم شدند. هر دو گروه از نظر شرایط محیطی، مدیریتی، تولید شیر و نوبت زایش مشابه بودند و در یک بازه زمانی ۵ ماهه (مهر ماه تا بهمن ماه) تحت مطالعه قرارگرفتند. در آغاز مطالعه دستگاه تولید مثل گاوهای دو گروه با معاینه از طریق ملامسه مقعدی و اولتراسونوگرافی ارزیابی شده و فرمول تخمدانی آنها تعیین گردید. سرانجام با دوبار تزریق αPGF_2 (Lutalyse, Zeotis co.) به فاصله ۱۱ روز گاوهای هر دوگروه در یک زمان قبل از آغاز دوره درمان با هم فحل شدند.

از آغاز این چرخه فحلی خونگیری و جداسازی و فریز سرم در روزهای ۵، ۹، ۱۳ و ۱۸ چرخه صورت گرفت و معاینات مقعدی و سونوگرافی از تخمدان و رحم در همان روزهای چرخه فحلی انجام شد. سرانجام پس از بروز علائم فحلی در گاوها خوراندن دارو به گروه تیمار آغاز گردید، به طوریکه روزانه ۵۰^{cc} از عصاره هیدروالکلی گیاه پنج انگشت (شرکت داروسازی پورسینا) در ۵۰۰^{cc} آب رقیق و به هر گاو گروه تیمار خورانده شد، در گروه شاهد نیز همزمان دارونما ساخته شده توسط شرکت سازننده خورانده شد. پس از ۲۱ روز خوراندن دارو (حدوداً یک چرخه فحلی) گاوها مجددا با دوبار تزریق αPGF_2 به فاصله ۱۱ روز همزمان شدند. با شروع چرخه جدید خوراندن دارو به گروه تیمار و خوراندن دارونما به گروه شاهد به صورت روزانه تا انتهای چرخه فوق ادامه یافت. درطی این چرخه نیز خونگیری وجدا سازی وفریز سرم در روزهای ۵، ۹، ۱۳ و ۱۸ چرخه وثبت علائم فحلی در هر گاو صورت گرفت. همچنین همانند چرخه‌های قبل سونوگرافی از تخمدان‌ها و رحم در زمان‌های مشخص از چرخه انجام و تصاویر تخمدان‌ها تهیه شدند.

در طی این چرخه فحلی، گاوها مورد معاینه روزانه قرارگرفته و تا انتهای چرخه داده‌های حاصل از معاینات یادداشت و فرمول تخمدانی هرگاو با توجه ساختارهای قابل لمس روی تخمدان و قوام رحم درلمس مقعدی و سونوگرافی های انجام شده تعیین و حدود روز چرخه فحلی هرگاو با توجه به آغاز فحلی همزمان شده روز به روز تعیین و تایید می شد.

پس از اتمام چرخه مطالعه از میان سرم خون‌های جمع‌آوری شده از گاوها در طی چرخه درمان، نمونه‌هایی که در روز ۵، ۹، ۱۳ و ۱۸ چرخه اخذ شده بودند، جهت تعیین مقدار غلظت کورتیزول، پروژسترون و LH در سرم خون به آزمایشگاه ارسال شد و بوسیله کیت‌های الایزا میزان آنها تعیین گردید. سرانجام داده‌های مطالعه شامل غلظت هورمون

کورتیزول، هورمون پروژسترون و هورمون LH در برنامه اکسل مرتب شده و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 20.0 انجام شد. داده‌های توصیفی به صورت انحراف معیار ± خطای معیار (Mean±SEM) بیان شدند. آزمون normality test با انجام تست Kolmogorov- Smirnov صورت پذیرفت و با توجه به میزان p.value بالای پنج صدم، نرمال بودن داده‌ها تایید شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در زمان‌های مختلف (روند زمانی تغییرات) در داخل هر گروه از رویه مدل عمومی خطی (GLM) برای داده‌های تکراری از (Repeated Measures) استفاده شد. برای مقایسه داده‌ها در دو گروه تیمار و شاهد از آزمون t مستقل (Independent t test) و برای مقایسه دو به دو در هر زمان در گروه تیمار قبل و بعد از درمان از آزمون t زوجی (Paired t test) استفاده شد و (P<۰/۰۵) معنی‌دار در نظر گرفته شد.

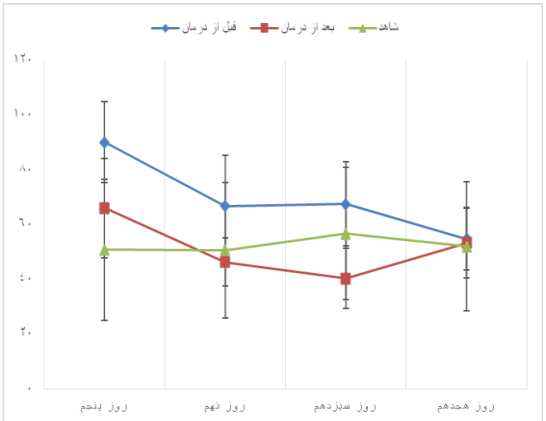
نتایج

۱- میانگین غلظت کورتیزول سرم

میانگین غلظت کورتیزول سرم خون در گروه تیمار و شاهد در طی روزهای مختلف سیکل فحلی با هم مقایسه شده است. میزان میانگین غلظت کورتیزول به صورت X±SEM و برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شده است. میزان میانگین غلظت کورتیزول در روز ۵، ۹، ۱۳ و ۱۸ سیکل فحلی در گروه تیمار در دوره پس از درمان نسبت به دوره قبل از درمان کمتر بود بویژه در اوایل چرخه جنسی ولی از نظر اماری اختلاف معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵) (جدول و نمودار ۱).

جدول ۱ـ بررسی میانگین و انحراف خطای معیار غلظت کورتیزول بر حسب نانو گرم بر میلی‌لیتر در گروه‌های تیمار و شاهد

روز سیکل فحلی	گروه درمان قبل از درمان	گروه درمان بعد از درمان	گروه شاهد	P Value	
				گروه تیمارقبل و بعد از درمان	گروه‌های شاهد و تیمار
۵	۹۰/۱٤±۰۰/۷۹	٦٦/۱۸±۰٤/۲۲	۵۰/۲۵±۷۷/۸٤	۰/٦۵	۰/٦۵
۹	٦٦/۱۸±۷٤/٦۸	٤٦/۸±۳۳/۷۹	۵۰/۲٤±۵۹/۸۵	۰/۵۵	۰/۸۷
۱۳	٦۷/۱۵±۵۲/٤٤	٤۰/۱۰±۲۰/۹۹	۵٦/۲٤±٦۸/۱۸	۰/٤۱	۰/۵۷
۱۸	۵٤/۱۱±۷٤/۳۷	۵۳/۱۲±۲٦/۸۵	۵۱/۲۳±۹۲/۵۹	۰/۹۷	۰/۹٦



نمودار ۱ـ نمودار میانگین غلظت کورتیزول (نانو گرم در میلی‌لیتر) در گروه شاهد و گروه تیمار (قبل و بعد از درمان)

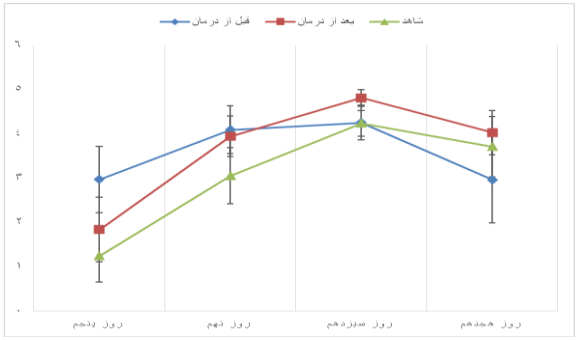
۲- میانگین غلظت پروژسترون سرم

میانگین غلظت پروژسترون سرم خون در گروه تیمار و شاهد در طی روزهای مختلف سیکل فحلی با هم مقایسه شده است. میزان میانگین غلظت پروژسترون به صورت X±SEM و برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شده است. میزان میانگین غلظت پروژسترون در روزهای ۵ و ۹ سیکل فحلی در گروه تیمار در دوره پس از درمان نسبت به دوره قبل از درمان کمتر و نسبت به گروه شاهد بیشتربود ولی از نظر اماری اختلاف معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵) اما در روزهای ۱۳ و ۱۸ سیکل فحلی در گروه تیمار در دوره پس از درمان نسبت به

دوره قبل از درمان و گروه شاهد بیشتر بود ولی از نظر اماری اختلاف معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵). ولی در نیمه دوم چرخه افزایش غلظت پروژسترون در گروه تیمار دیده می شود (جدول و نمودار ۲).

جدول ۲ـ بررسی میانگین و انحراف خطای معیار غلظت پروژسترون بر حسب نانو گرم بر میلی‌لیتر در گروه‌های تیمار و شاهد

روز سیکل فحلی	گروه تیمار قبل از درمان	گروه تیمار بعد از درمان	گروه شاهد	P Value	
				گروه تیمار قبل و بعد	گروه شاهد و گروه تیمار
۵	۲/۰±۹۸/۷۵	۱/۰±۸٤/۷۳	۱/۰±۲۵/۵۹	۰/۵۹	۰/۵
۹	٤/۰±۱۰/۵٤	۳/۰±۹۵/٤٦	۳/۰±۰٦/٦۳	۰/۹٦	۰/۲
۱۳	٤/۰±۲٦/۳۹	٤/۰±۸۲/۱۹	٤/۰±۲۵/۲۹	۰/۲۱	۰/۱
۱۸	۲/۰±۹۷/۹۸	٤/۰±۰٤/۵۰	۳/۰±۷۲/٦۸	۰/۲٦	۰/۷



نمودار ۲ـ نمودار میانگین غلظت پروژسترون (نانو گرم بر میلی‌لیتر) در گروه شاهد (پس از درمان) و گروه تیمار (قبل و بعد از درمان)

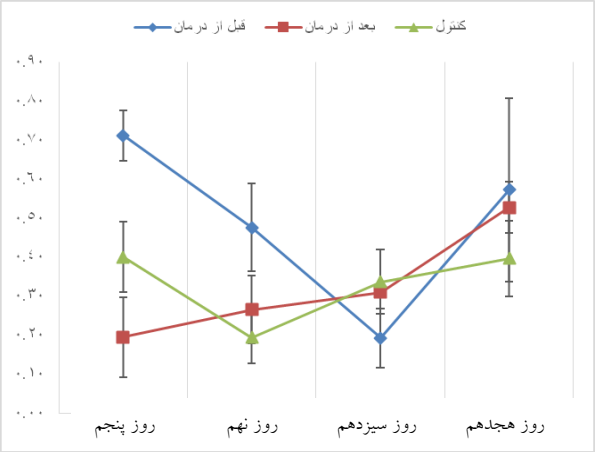
میزان میانگین غلظت LH به صورت X±SEM و برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شده است. میزان میانگین غلظت LH در روزهای ۵ و ۹ سیکل فحلی در گروه تیمار در دوره پس از درمان نسبت به دوره قبل از درمان کمتر (به ترتیب P =۰/۰۰۱ و P=۰/۰۳) و در روز ۱۳ سیکل فحلی در گروه تیمار در دوره پس از درمان نسبت به دوره قبل از درمان بیشتر بود ولی از نظر اماری اختلاف معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵) وگروه تیمار دردوره پس از درمان با گروه شاهد مشابه بود مگر در روز ۹ سیکل فحلی که در گروه تیمار دوره پس از درمان غلظت LH خون بیشتر بود ولی از نظر اماری اختلاف معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵) (جدول و نمودار ۳).

۳- میانگین غلظت LH سرم

میانگین غلظت LH سرم خون در گروه تیمار و شاهد در طی روزهای مختلف سیکل فحلی با هم مقایسه شده است.

جدول ۳ـ بررسی میانگین و انحراف خطای معیار غلظت LH بر حسب نانو گرم بر میلی‌لیتر در گروه تیمار و شاهد

روز سیکل فحلی	گروه تیمار قبل از درمان	گروه تیمار بعد از درمان	گروه شاهد	P Value	
				گروه تیمار قبل و بعد	گروه‌های شاهد و تیمار
۵	۰/۰±۷۱/۰٦	۰/۰±۱۹/۱۰	۰/۰±٤۰/۰۹	۰/۰۰۱	۰/۱۵
۹	۰/۰±٤۸/۱۱	۰/۰±۲۷/۰۹	۰/۰±۱۹/۰۷	۰/۳	۰/۵۲
۱۳	۰/۰±۱۹/۰۷	۰/۰±۳۱/۱۱	۰/۰±۳٤/۰۸	۰/٦۷	۰/۸٤
۱۸	۰/۰±۵۷/۲۳	۰/۰±۵۳/۰٦	۰/۰±٤۰/۰۹	۰/۸	۰/۲۹



نمودار ۳ ـ نمودار میانگین غلظت LH (نانو گرم بر میلی‌لیتر) در گروه شاهد و گروه تیمار (قبل و بعد از درمان)

بحث

بررسی نتایج نشان می‌دهد که اختلاف در میزان کورتیزول سرم خون از نظر آماری درگروه تیمار نسبت به گروه شاهد و گروه تیمار در دو دوره قبل و بعد از درمان در هیچ یک از روزهای تحت مطالعه، معنی‌دار نیست. از طرفی مطالعه و مقایسه دقیق نشان می‌دهد که غلظت کورتیزول سرم علیرغم اختلاف غیر معنی‌داری از لحاظ آماری، در گروه تیمار در دوره پس از درمان نسبت به دوره قبل از درمان در کلیه روزهای تحت مطالعه، روند کاهشی داشته است که به نظر می‌رسد، این امر احتمالاً به دنبال مصرف گیاه ویتکس ایجاد شده باشد (جدول ۱).

مطالعه مدونی در زمینه استفاده از گیاه پنج انگشت در نشخوار کننده موجود نمی‌باشد و تنها ۲ محصول تجاری از گیاه ویتکس جهت درمان اسبان مبتلا به بیماری کوشینگ، آزمایش شده است. یک مطالعه کلینیکی بر روی ۲۵ اسب و پونی مبتلا به بیماری کوشینگ صورت گرفت که گیاه پنج انگشت طی یک دوره ۳ ماهه تجویز شد. به هر یک از حیوانات در این مطالعه روزانه عصاره گیاه ویتکس آگنوس ـ کاستوس در طی دوره مطالعه تجویز شد. در این مطالعه کاهش پرمویی و متعاقب آن کاهش هیپرهیدروزیس، بهبود ذخیره انرژی، بهبود رفتار حیوان، یک کاهش مشخص در بروز لنگش، کاهش تکرر ادرار، پرنوشی و کاهش در تجمع غیرطبیعی چربی مشاهده شد(۲۲).

در یک مطالعه دیگر، اثرات یک مکمل تجاری موجود از گیاه ویتکس (Evitex®) را روی ۱٤ اسب با علائم مشخص بیماری کوشینگ بررسی کردند. در این مطالعه میزان ACTH و انسولین، همراه با تغییرات در پرمویی، تجمع چربی، افزایش وزن، لنگش، بی‌حالی و چرخه های فحلی غیر طبیعی بررسی شد. اسب‌های مورد مطالعه به مدت ۲ تا ٦ ماه براساس دوز توصیه شده توسط کارخانه سازنده درمان شدند. اکثر اسب‌هایی که متعاقباً به آنها داروی پرگولید تجویز شد، بهبود یافتند(۳).

با بررسی میزان غلظت پروژسترون سرمی در گروه تیمار و شاهد (جدول ۲) نشان می‌دهد که اختلاف در میزان پروژسترون سرم خون از نظر آماری درگروه تیمار نسبت به گروه شاهد و گروه تیمار در دوره قبل و بعد از درمان در هیچ یک از روزهای تحت مطالعه، معنی‌دار نیست. ازطرفی مطالعه و مقایسه دقیق نشان می‌دهد که غلظت پروژسترون سرمی علی رغم اختلاف غیر معنی‌دار از لحاظ آماری، در گروه تیمار در دوره پس از درمان نسبت به دوره قبل از درمان در روزهای ۱۳ و ۱۸ چرخه روندی افزایشی داشته (٤/۸۲±۰/۱۹ در مقابل ٤/۲٦±۰/۳۹ و ٤/۰٤±۰/۵۰ در مقابل ۲/۹۷±۰/۹۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر) همچنین مقدار غلظت پروژسترون در روزهای مختلف چرخه در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد روندی افزایشی داشته است که به نظر می رسد که این امر احتمالاً به دنبال مصرف گیاه ویتکس ایجاد شده باشد. بررسی و مقایسه نمودار خطی ۲ که میزان غلظت پروژسترون سرمی را در روزهای مختلف چرخه نشان می‌دهد و مقایسه تفاوت میزان پروژسترون بیانگر این است که احتمالاً مصرف عصاره گیاه ویتکس منجر به افزایش سریعتر و بیشتر غلظت سرمی پروژسترون در فاز لوتئال (روزهای ۱۸و۱۳) شده است.

همچنین مشهود است که میزان پروژسترون سرمی در گروه تیمار در روز ۱۸ دوره پس از درمان نسبت به دوره قبل از درمان در سطح بالاتری قرار دارد.

با بررسی میزان غلظت LH سرمی در گروه تیمار و شاهد (جدول ۳) مشخص گردید که اختلاف در میزان LH سرم خون از نظر آماری درگروه تیمار نسبت به گروه شاهد در هیچ یک از روزهای تحت مطالعه، معنی‌دار نیست و در گروه تیمار در دوره قبل از درمان نسبت به دوره بعد از درمان تنها در روز ۵ چرخه (۷۱/۰۶±۰/۰ در مقابل ۰/۱۰±۰/۱۹ نانوگرم بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P=۰/۰۰۱). از طرفی مطالعه و مقایسه دقیق نشان می‌دهد که میانگین غلظت LH سرمی در گروه تیمار بعد از درمان تنها در روز ۱۳ چرخه نسبت به دوره قبل درمان افزایش داشته است (۰/۱۱±۰/۳۱ در مقابل ۱۹/۰۷±۰/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر). نکته قابل توجه این است که در گروه تیمار نسبت به سایر گروه‌ها، با طی روزهای چرخه میانگین غلظت LH افزایش داشته است و این افزایش معنی‌دار بوده است و میتوان اینگونه استنباط کرد که مصرف گیاه ویتکس منجر به تنظیم ترشح LH در گروه تیمار شده است.

مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند که عصاره گیاه از طریق اثر بر بخش قدامی غده هیپوفیز وکاهش هورمون FSH و افزایش هورمون LH تولید هورمون پروژسترون را تحریک می کند(۲). Haller در سال ۱۹۶۱ اثر عصاره گیاه ویتکس را بر روی خوکچه هندی بررسی کرد و مشخص شد که مصرف دوزهای مختلف گیاه پنج انگشت به مدت ۹۰ روز در خوکچه هندی ماده، اثرات استروژنی را کاهش و اثرات پروژسترونی را افزایش داد. در این مطالعه پس از ۲۰ روز مصرف دارو وزن غده هیپوفیز، فوق کلیه و رحم به طور مشخص کاهش یافت نتایج حاصل از این یافته‌ها به طور اولیه نشان می‌دهند که محل اثر گیاه ویتکس در بخش قدامی هیپوفیز بوده و اثرات ایجاد شده با دوزهای پایین به این صورت تفسیر گردید که موجب ایجاد یک اثر تحریکی روی ترشح LH و یک اثر مهاری بر روی ترشح FSH شده است. با مصرف دوزهای بالای ویتکس، تمام عملکردهای لب قدامی هیپوفیز تضعیف شد(۸).

بررسی Losh و همکارانش در سال ۱۹۹۰ که بر روی ۲۰ زن بیمار مبتلا به آمنوره ثانوی انجام شد، نتایج آزمایشگاهی میزان پروژسترون ، LH و FSH در ۱۵ نفر از بیماران افزایش مشخص میزان پروژسترون و LH را نشان داد در حالی که مقادیر FSH تغییر نکرد یا به میزان کمی کاهش یافته بود (۱۳).

در مطالعه‌ای برروی اثر گیاه ویتکس بر عملکرد جسم زرد در ٤٨ زن نابارور به مدت ۳ ماه توسط Propping و همکارانش انجام شد، نشان داد که میزان پروژسترون در مرحله میانی فاز لوتئال به حد طبیعی رسیده و در مقایسه با قبل از درمان چرخه‌های قاعدگی کوتاه افراد تنظیم و ۷ نفر از افراد شرکت کننده در مطالعه باردار شدند(۱۵و۱٤).

در گزارشی که توسط پ Stanoz درسال ۱۹۹۷ در لهستان ارائه شد، مشخص گردید که پس از ۹۰ روز مصرف عصاره گیاه در زن‌های مبتلا به هیپرپرولاکتینمیا میزان هورمون LH(P<۰/۰۱) استرادیول (P<۰/۰۰۱) و پروژسترون (P<۰/۰۲) به طور مشخص افزایش یافت (۱۷). در پژوهشی که توسط Wuttke در سال ۲۰۰۳ بر روی زن‌های مبتلا به هیپرپرولاکتینمیای نهفته، همراه با کمبود لوتئال بودند، صورت گرفت، پس از مصرف ۳ ماه عصاره گیاه، پالس‌های LH تنظیم شده و میزان بالای پرولاکتین کاهش یافت و میزان متوسط پروژسترون سرم افزایش یافت و پالس‌های LH سبب افزایش ترشح پروژسترون و استرادیول فاز لوتئال گردید(۲۱).

در مطالعه‌ای که توسط Higham و همکارانش در سال ۲۰۰۷ بر روی بابون‌های پارک ملی نیجریه انجام گرفت مشخص شد، در فصولی از سال که این بابون‌ها از گیاه Vitex doniana که از گونه ویتکس آگنوس ـ کاستوس است، مصرف می‌کنند، به‌دلیل وجود ترکیبات شبه پروژسترونی در گیاه و افزایش سطح پروژسترون در پاسخ به مصرف میوه‌های گیاه در بابون‌های این پارک ایجاد شد(۹). در سال ۲۰۰۸ در بررسی که بر روی شانپانزه‌های پارک ملی گامبی توسط Thompson صورت

گرفت، مصرف میوه‌های گیاه Vitex fischeri از گونه ویتکس آگنوس ـ کاستوس باعث یک افزایش ناگهانی در میزان پروژسترون ادرار نسبت به میزان نرمال در شانپانزه‌های ماده شد(۱۷).

با توجه به مطالعات فوق که اکثراً دال بر اثر گیاه ویتکس آگنوس ـ کاستوس روی افزایش میزان LH در انسان، پریمات‌ها و حیوانات آزمایشگاهی است، در پژوهش انجام شده فوق علی‌رغم عدم معنی‌دار بودن نتایج میزان LH سرمی در طی چرخه فحلی از نظر آماری، اما اینگونه بنظر می‌آید که میزان LH در نیمه اول فاز لوتئال نسبت به گروه شاهد پس از درمان و گروه تیمار در دوره قبل از درمان کاهش داشته است که می‌تواند بدلیل خاصیت اپیوئیدرژیک گیاه پنج انگشت باشد و در روز ۱۳ نسبت به سایر گروه‌ها افزایش نشان می‌دهد که همزمان با افزایش میزان پروژسترون است.

با توجه به اینکه مطالعات مختلف نشان می‌دهند که عصاره گیاه ویتکس بر محور هیپوتالاموسی ـ هیپوفیزی اثر می‌گذارد مشخص شده است که مصرف ٤ تا ٨ هفته از گیاه موجب افزایش هورمون LH و پروژسترون می‌شود و همچنین مطالعات Ibrahim و همکارانش در سال ۲۰۰۷ روی رت نشان داد که مصرف عصاره گیاه علاوه بر افزایش میزان پروژسترون و استروژن پلاسما در فاز لوتئال موجب افزایش ٤٠ درصدی وزن تخمدان در رت های درمان شده در مقایسه با رت های درمان نشده در فاز لوتئال گردید(۲).

براساس مطالعات فوق و پژوهش‌های گوناگون انجام شده که نشان دهنده اثر افزایش عصاره گیاه بر روی پروژسترون و هورمون LH می‌باشند. با توجه به نتایج به دست آمده احتمالا مصرف عصاره گیاه در گروه تیمار منجر به افزایش پروژسترون شده و همچنین کاهش میزان کورتیزول در طول چرخه قابل مشاهده است. مکانیسم اثر گیاه ویتکس به طور واضح مشخص نیست. شناخته شده‌ترین مکانیسم‌های مطالعه شده از گیاه وتیکس از طریق اثر برگیرنده‌های دوپامینی، اوپیوئیدی و استروژنی β می‌باشد که به نظر می‌رسد با اثر برگیرنده‌های فوق روی تنظیم محور هیپوتالاموسی ـ هیپوفیزی ـ تخمدانی مؤثر است(۵). چندین ترکیب دایترپنوئیدی شامل روتوندیفوران و کلرودادینول‌ها در عصاره گیاه ویتکس یافت شده‌اند که فعالیت آگونیستی روی گیرنده‌های D_2 دوپامینی از خود نشان می‌دهند، این اثر دوپامینژیک گیاه در دو سطح هیپوتالاموسی و هیپوفیز قدامی قابل بحث است(۲۱).

برخی از مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته نشان می‌دهند که دوپامین ترشح GnRH و نهایتاً LH را تحریک می‌کند. همچنین عنوان شده است که ترشح LHRH از سلولهای کشت شده ناحیه مدیوبازال هیپوتالاموس رت‌های نر سالم یا رت‌های ماده اوریکتومی شده و درمان شده با استروژن در شرایط آزمایشگاهی تنها بوسیله دوپامین افزایش می‌یابد. علاوه براین، داده‌های متناقضی نیز مبنی براثر دوپامین روی ترشح LH در بدن موجود زنده و شرایط آزمایشگاهی وجود دارد. با در نظر گرفتن تمام مطالعات صورت گرفته ممکن به نظر می‌رسد که دوپامین ترشح گنادوتروپین‌ها را با تنظیم GnRH در سطح هیپوتالاموسی تنظیم می‌کند. (٦).

در سطح هیپوفیز با توجه به اینکه شناخته شده‌ترین مکانیسم مطالعه شده از گیاه ویتکس از طریق اثر آگونیستی بر روی گیرنده‌های D_2 دوپامینی در هیپوفیز قدامی بوده و در محیط کشت سلول‌های لاکتوتروپ و در بدن موجود زنده ترشح پرولاکتین را کاهش داده است (۲۱ و ۸، ۷).

مکانیسم دیگری که از طریق آن عصاره گیاه ویتکس می‌تواند اثرات آندوکرینولوژیک خود را روی سیستم تولیدمثلی القاء کند، سیستم اوپیوئیدی است. در مطالعات صورت گرفته اتصال به گیرنده‌های اوپیوئیدی مو، کاپا توسط ترکیبات موجود در گیاه گزارش شده است. سیستم اوپیوئیدی شامل گیرنده‌های مو، کاپا، سیگما و پپتیدهای اوپیوئیدی همچون بتااندروفین‌ست. این پپتیدها در تنظیم چرخه فحلی ازطریق مهار محور هیپوتالاموسی ـ هیپوفیزی ـ آدرنال نقش دارند. بنابراین اوپیوئیدها هم به طور مستقیم در تنظیم GnRH و تنظیم آزادسازی LH و FSH از هیپوفیز نقش دارند و هم با کمک سیستم دوپامینرژیک که نقش

تنظیم سیستم اوپیوئیدرژیک را دارا است به طور غیر مستقیم بر تنظیم GnRH و نهایتاً گنادوتروپین‌ها مؤثراند (۱۹).

مکانیسم مورد مطالعه دیگری که احتمالاً عصاره گیاه ویتکس از طریق آن می‌تواند نقش خود را ایفا نماید احتمالاً از طریق ترکیبات فیتواستروژنی موجود در گیاه است. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهند که آپی ژنین موجود در عصاره گیاه ویتکس بیشترین خاصیت آگونیستی را نسبت به گیرنده‌های استروژنی بتا از خود نشان می‌دهد(۲۱). مطالعات صورت گرفته وجود گیرنده‌های استروژنی بتا را در تخمدان گاو نشان داده است(۲۰و۱٦). بنابراین گیاه ویتکس آگنوس ـ کاستوس به واسطه ترکیبات آگونیستی گیرنده‌های استرووژنی بتا و احتمالاً با اثر بر روی تخمدان و با نقش تنظیمی گیرنده‌های استروژنی بتا در تنظیم رشد فولیکولی نقش مهمی را در تنظیم محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیزی ـ تخمدانی و در سطح تخمدان خواهد داشت.

در نهایت با توجه به مطالب یاد شده درخصوص اثرات دوپامیزژیک، اوپیوئیدرژیک و فیتواستروژنی گیاه ویتکس و نقش آگونیست‌های دوپامینی، اوپیوئیدی و استروژنی در تنظیم آندوکرینولوژی محور هیپوتالاموس ـ هیپوفیز ـ تخمدان و محور هیپو تالاموس ـ هیپوفیز ـ آدرنال و در نهایت تنظیم چرخه تولید مثلی نمی‌توان اثرات گیاه را منحصراً به ترکیب خاصی از گیاه نسبت داد زیرا که عصاره گیاه ترکیبی متشکل از انواع مواد با خصوصیات دوپامینی، اوپیوئیدی و فیتواستروژنی بوده و در حقیقت برآیند حاصل از اثرات آنها و احتمالاً از طریق مسیرهای درون ریز یاد شده به تنظیم سیستم تولید مثل کمک می‌نماید.

با توجه به نتایج حاصل در پروژه فوق که اثرات گیاه ویتکس را در سطح تخمدان، میزان پروژسترون، میزان کورتیزول و میزان LH سرمی گاوهای شیری مورد مطالعه و ارزیابی قرار داد، و بررسی محورهای احتمالی یاد شده در مورد اثرات گیاه بر سیستم تولیدمثل که به طور عمده نقشی تنظیم‌کننده بر گنادوتروپین‌ها درسطح هیپوتالاموس و هیپوفیزی دارد و هم اینکه احتمالاً پاسخ تخمدان را نسبت به پالس‌های LH می‌تواند افزایش دهد که شاید با اثرات لوتئوتروفیک ناشی از عصاره گیاه بر روی جسم زرد تخمدان در گاوهای درمان شده با عصاره گیاه همخوانی داشته، به طوری که نتایج فوق نیز تا حدودی در سایر گونه‌های پستانداران همچون رت، انسان، پریمات‌ها، خوکچه هندی به اثبات رسیده است.

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه فوق احتمالا می‌توان در مطالعات بعدی از گیاه ویتکس آنگوس به عنوان دارویی جایگزین در کمبود فاز لوتئال که از موارد مهم مطرح در بازگشت به فحلی و مرگ زودرس جنین در ماه‌های اول آبستنی در گاو شیری است، بهره برد، همچنین پیشنهاد می شود در مطالعات آینده از عصاره این گیاه جهت کاهش سطح کورتیزول خون، در موارد استرس گرمایی در سطح گله بصورت آزمایشی استفاده نمود.

فهرست منابع

۱. ثابتی، ح.، (۱۳۸۱)، جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران، انتشارات دانشگاه یزد. ۱۲۸-۱۱۷.

۲. کاظمیان، ا.، برومندفر، خ.، قنادی، ع.، نوریان، ک.، «بررسی تاثیر ویتاگنوس و پاسی پی بر گر گرفتگی دوران یائسگی زنان»، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، بهار ۱۳۸٤; ۷(۱):٤٥-۳۹.

3. Beech, J., Donaldson, M.T., Lindborg, S. (2002): Comparison of Vitex agnus castus Extract and Pergolide in Treatment of Equine Cushing's Syndrome, AAEP Proceedings, 48:175-177.
4. Bleier, W. (1959): Phytotherapy in irregular menstrual cycles or bleeding periods and other gynecological disorders of endocrine origin, Zentralblatt Gynakol; 81:701-9.
5. Braun, L., Cohen, M. (2007): Herbs and Natural Supplements: An Evidence-Based Guide, 2ND EDITION, Sydney: Elsevier Australia, 721-724.

6. De Rensis, F. (1998): Involvement of the opioidergic and dopaminergic system in the central regulation of gonadotropin secretion, Annals of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Parma , Vol. XVIII, 234-236.
7. De Rensis, F. (1999): The involvment of prolactin in the mechanisms regulating reproduction during the post-partum period, Università degli Studi di Parma Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Vol. XIX, 132-133.
8. Haller, J. (1961): The effect of plant extracts on the hormonal interrelations between hypophysis and the ovary. An endocrinological study with animal experiments. J. Gebur. Gynakol 156: 274-302.
9. Higham, J. P., Ross, C., Warren, Y., Heistermann, M., MacLarnon, A. M. (2007): Reduced reproductive function in wild baboons (Papio hamadryas anubis) related to natural consumption of the African black plum (Vitex doniana), Hor. Behav. 52(3):384-390.
10. Ibrahim, N. A., Shalaby, A. S., Farag, R. S., Elbaroty, G. S., Nofal, S. M. and Hassan, E. M. (2008): Gynecological efficacy and chemical investigation of Vitex agnus-castus L. fruits growing in Egypt, NaturalProduct Research. 22(6):537-546.
11. Kaneko, K., Machida, I., Iki, N., Sawada, H., Kawakami, S. (2004): Ultrasonographic Evaluation of the Corpus-luteum Function in Holstein Cows, Jap. Vet. Med.Asso 57(7):31-434.
12. Liu, J., Burdette, J.E., Breemen, R., Booth, N. (2001): Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms, Journal of Agricultural and Food chemistry 49 (5) 2472-2479.
13. Losh, E.G., Katzorke, T. (1990): Diagnosis and treatment of dyshormonal menstrual periods in the general practice, Gynakol Praxis, 14:3,489-95.
14. Propping, D., Katzorke, T. (1987): Treatment of corpus luteum insufficiency, Zeits Allgemeinmedizin 63: 932-3.
15. Propping D, et al. (1988): Diagnosis and therapy of corpus luteum insufficiency in general practice, Therapiewoche 38:2992-3001.
16. Rosenfeld, C. S., Yuan, X., Manikkam, M., Calder, M. D., Garverick, H. A., Lubahn, D. B. (1999): Cloning, Sequencing, and Localization of Bovine Estrogen Receptor-ß within the Ovarian Follicle, Biology of Reproduction 60: 691-697.
17. Thompson, M. E., Wilson, M. L., Gobbo, G., Muller, M. N., Pusey, A. E. (2008): Hyperprogesteronemia in response to Vitex fischeri consumption in wild chimpanzees (Pan troglodytes schweinfurthii), Am. J. Prim. 70 (11):1064 – 1071.
18. Webster, D.E., Lu, J., Chen, S.-N., Farnsworth, N.R., Jim Wang, Z. (2006): Activation of the μ-opiate receptor by Vitex agnus-castus methanol extracts: Implication for its use in PMS, J. Ethnopharm, 106(2): 216-221.
19. Woodruff, T. K., Mayo, K. E. (2005): To ß or Not To ß: Estrogen Receptors and Ovarian Function, Endo. 146(8): 3244-3246.
20. Wuttke, W., et al. (2003): Chaste tree (Vitex agnus-castus): pharmacology and clinical indications, Phytomedicine 10.4(2003): 348-57. Wynn, S., Fougere, B. (2007): Veterinary Herbal Medicine, Published by Mosby, 452-456.