



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

دوره پنجم، شماره اول، بهار ۱۳۹۳

صفحات ۱-۷

اثرات ناباروری عصاره آبی گیاه افدرا ماژور (*Ephedra major*) بر پارامترهای بافت شناختی رحم موش های ماده بالغ Balb/C

مهسا قوسی^۱، پروین تراب زاده^{۲*}، منیره موحدی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی-تکوینی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد کرج، ایران

۲- استادیار زیست شناسی سلولی-تکوینی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران

۳- استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران

*نویسنده مسئول: Torabzadeh@kiau.ac.ir

چکیده

متجاوز از ۵۰۰۰ سال است که گیاه افدرا (*Ephedra*) جهت درمان انواع سرماخوردگی ها، تب، آنفلوآنزا، تنگی نفس، خس خس قفسه سینه و گرفتگی بینی استفاده می شود. همچنین این گیاه در ترکیب مکمل های رژیم غذایی جهت کاهش وزن، افزایش انرژی و افزایش نیروی جسمانی ورزشکاران (مخصوصاً ورزشکاران زن) مورد استفاده قرار می گیرد. از طرفی شواهد حاکی از استفاده سنتی این گیاه در ایران جهت پیشگیری از بارداری و یا سقط جنین می باشد. به همین خاطر تصمیم گرفته شد تا اثرات ناباروری این گیاه، روی رحم موش های ماده بالغ Balb/C مورد مطالعه قرار گیرد، چون علی رغم استفاده سنتی این گیاه، تاکنون هیچ مطالعه داخلی و یا خارجی در این زمینه گزارش نشده است. عصاره آبی گیاه افدرا ماژور به روش استاندارد عصاره گیری تهیه گردید که در طی آن، هر میلی لیتر از محلول تهیه شده عصاره، حاوی ۵۰ mg از پودر گیاه می باشد. بعد از تهیه عصاره، دوز کشنده آن (LD 50) در شرایط *in vivo* حدود ۳/۱ g/kg.bw تعیین شد. با در نظر گرفتن دوز آستانه ای، با انتخاب سه دوز پایین ۱۰۰ mg/kg.bw، متوسط ۲۰۰ mg/kg.bw و بالا ۳۰۰ mg/kg.bw آزمایشات ادامه یافت و تزریقات طی ۸ روز متوالی بصورت درون صفاقی (IP) به موش های ماده بالغ Balb/C با وزنی معادل ۲۶-۲۴ gr انجام گرفت. همزمان با گروه های تجربی، گروه کنترل (عدم تزریق) و شاهد (تزریق آب مقطر) نیز برای مقایسه ای جواب ها در نظر گرفته شد. فردای آخرین روز تزریق، موش ها تشریح و رحم ها خارج گردیدند. جهت اطمینان از نتایج، تجربیات فوق ۳ بار مورد تکرار قرار گرفته و داده ها توسط نرم افزار SPSS17 آزمون آماری Duncan و Tukey سنجش شدند. نتایج حاکی از کاهش معنادار اقطار رحم در دوز ۳۰۰ mg/kg.bw ($P<0.001$) و ۲۰۰ mg/kg.bw ($P<0.05$) و افزایش در دوز ۱۰۰ mg/kg.bw (عدم معناداری)، کاهش معنادار ضخامت آندومتر در دوز ۳۰۰ g/kg.bw ($P<0.05$)، افزایش معنادار ارتفاع سلول های اپی تلیوم در دوز ۱۰۰ g/kg.bw ($P<0.001$) و کاهش معنادار ارتفاع سلول های اپی تلیوم در دوز ۳۰۰ g/kg.bw ($P<0.001$) می باشد. شواهد نشان دهنده افزایش توان باروری رحم در دوز تزریقی پایین و کاهش توان باروری در دوز تزریقی بالا می باشد. بنابراین متناسب با دوز مصرفی گیاه افدرا ماژور، این گیاه دارای اثرات دو جانبه ای بوده که می تواند دارای مصارف پزشکی فراوانی نیز باشد.

واژه های کلیدی: افدرا ماژور، رحم، آندومتر، اپی تلیوم.



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 5(1)1-7, 2014

Infertility effects of Ephedra major aqueous extract on uterine histological parameters of adult female Balb/C mice

Ghosi, M.¹, Torabzadeh, P.^{2*}, Movahedi, M.³

1- Master of Developmental Sciences in Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj, Iran

2- Assistant Professor of Developmental Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj, Iran

3- Assistant Professor of Biochemistry, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj, Iran

* *Corresponding author: Torabzadeh@kiaiu.ac.ir*

Abstract

Ephedra has been used for more than 5,000 years to treat conditions such as colds, fever, flu, headaches, asthma, wheezing, and nasal congestion. It has also been an ingredient in many dietary supplements used for weight loss, increased energy, and enhanced athletic performance (especially in womankind). In Iran lots of documents were showed traditional usage of Ephedra major for sterility or abortion; so due to finding any studies about this subject we decided to study infertility effects of the aqueous extract of Ephedra major on the uterus of adult female Balb/C mice.

Aqueous extract of Ephedra major was provided in standard way of extraction. Final product of extract, containing the water soluble materials of 50mg Ephedra major powder per/ml. In this experimental study, adult females Balb/C mice (24-26gr.bw) were selected and divided randomly into five groups: Control (Intact), distilled water injected (Sham), Receiving 100mg/kg.bw of extract, Receiving 200mg/kg.bw of extract, Receiving 300mg/kg.bw of extract.

Intraperitoneal (IP) injections were applied for 8 consecutive days. A day after the last injection, animals were killed, cupped and their uterus were fixed for histological studies. The experiments were repeated three times. Microscopic studies showed a significant decrease in large and small diameters of uterus, height of epithelium ($P<0.001$) and endometrium ($P<0.05$) at dose of 300mg/kg.bw and significant increase in epithelium ($P<0.001$) at the dose of 100mg/kg.bw. These experiments resulted that aqueous extract of Ephedra major has two kinds of effects: infertility (200 and 300mg/kg.bw) and fertility (100mg/kg.bw).

Key words: Ephedra major, uterus, Endometrium, Epithelium.

مقدمه

فساد سلول‌های تصفیه کننده کبدی در آن‌ها بطور معناداری کاهش یافته بود(۵). هو-جان و همکاران با مطالعه بر روی زنان کره‌ای مصرف کننده افدرا، به نقش اعجازانگیز گیاه افدرا در کاهش سریع وزن بدنی اشاره کردند(۴). پینگ لی و همکاران بیان کردند که افدرا سبب انقباض عروق و افزایش فشار خون در میس‌ها می‌شود(۹).



تصویر ۱. گیاه افدرا ماژور در ارتفاعات کلاک استان البرز

(*Ephedra major* Host)

بنابراین در این تحقیق سعی شد تا قدم‌هایی جهت اثبات تاثیرات گیاه افدرا ماژور روی بافت رحم و باروری برداشته شود تا افراد با داشتن آگاهی‌های لازم در مورد گیاهان و فرآورده‌های گیاهی بتوانند به بهترین نحو از آنها استفاده کرده و از گسترش و شیوع ناباروری در جامعه و تحمل هزینه‌های هنگفت ناشی از آن جلوگیری گردد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش که یک مطالعه از نوع تجربی بود برای تهیه عصاره آبی گیاه افدرا ماژور از روش استاندارد عصاره گیری استفاده گردید(۱۲ و ۱۳). بدین گونه که ابتدا گیاه افدرا در اردیبهشت ماه از ارتفاعات کلاک، واقع در اطراف استان البرز، شهر کرج با مختصات جغرافیایی $35^{\circ}49'29''N$ و $51^{\circ}02'10''E$ جمع آوری گردید و توسط هیئت گیاه

استفاده از گیاهان دارویی به دلیل عوارض جانبی کمتر، دسترسی آسان‌تر، پذیرش راحت‌تر توسط افراد و مقرون به صرفه بودن از نظر اقتصادی، سابقه دیرینه‌ای دارد(۷). تقریباً ۶۰ درصد مردم که عمده آنان زنان هستند حداقل یک‌بار یک داروی گیاهی را در سال مصرف می‌کنند. بر اساس مدل‌های حیوانی، تاکنون گیاهان فراوانی با خواص قاعده‌آوری، سقط‌زایی و ممانعت کننده باروری شناسایی و معرفی شده‌اند. از طرفی ناباروری مشکلی است که در ۳۰-۱۵ درصد زوج‌ها دیده می‌شود و برخی از علل آن در زنان: انسداد لوله‌های رحمی، موکوس غیر طبیعی سرویکس، عدم توانایی تحمل جنین توسط رحم، تغییر ساختار آناتومیکی رحم و ... می‌باشد(۱۱). بنابراین برخی از گیاهان علی‌رغم مصارف گوناگون و گسترده، امکان دارد متناسب با میزان دوز مصرفی گیاه دارای اثرات جانبی نامطلوب و سوئی همچون ناباروری باشند.

گیاه افدرا از خانواده *Ephedraceae*، دارای یک جنس و بیش از ۵۰ گونه است که به‌طور فاصله‌دار و دور از یکدیگر در نواحی مختلف کره زمین، پراکنده شده‌است(۶). افدرا ماژور، گیاهی عموماً دو پایه، بالا رونده به ارتفاع یک متر و گاهی بیشتر، ساقه آن دارای انشعابات فراوان، ظاهر بندبند و غلافی از فلس‌ها در هر بند است که برگ‌های رشد نیافته آن به‌حساب می‌آیند(تصویر ۱). ماده اصلی گیاه افدرا، افدرین و پزدوافدرین می‌باشد که جهت درمان بیماری‌های: ضعف عضلانی، کاهش فشارخون، اختلالات خواب، روماتیسم و ... مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱).

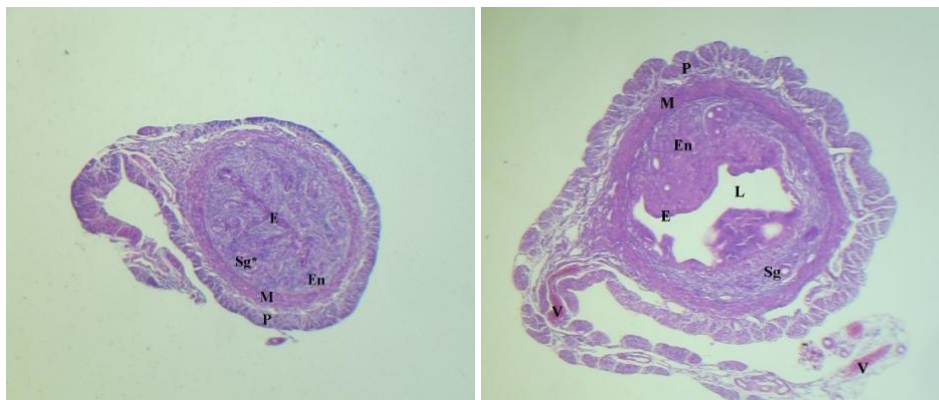
پیتل و همکاران بیان کردند که گیاه افدرا به علت القاء ترشح انسولین دارای اثرات ضد دیابتی می‌باشد(۸). چی و همکاران نیز اثرات نیروزایی و افزایش توان فیزیکی بدن توسط گیاه افدرا را معرفی کردند(۲). ایکوهیرو و همکاران بیان کردند که موش‌های دارای آسیب کبدی دریافت کننده گیاه افدرا به میزان بسیار کمتری دچار مرگ شده و آپوپتوز و

ماده بالغ ۲۴ تا ۲۶ گرمی مورد استفاده قرار گرفت:
 گروه کنترل: عدم تزریق
 گروه شاهد: تزریق آب مقطر
 گروه تجربی ۱: دریافت روزانه ۱۰۰ mg/kg.bw عصاره آبی گیاه افدرا ماژور
 گروه تجربی ۲: دریافت روزانه ۲۰۰ mg/kg.bw عصاره آبی گیاه افدرا ماژور
 گروه تجربی ۳: دریافت روزانه ۳۰۰ mg/kg.bw عصاره آبی گیاه افدرا ماژور
 فردای آخرین روز تزریق، موش‌ها تشریح و رحم‌ها جهت برشگیری، رنگ آمیزی و مطالعات بافتی خارج گردیدند. بعد از مطالعه بافت‌ها و اندازه‌گیری قطر بزرگ و کوچک و سلول‌های رحمی توسط میکروسکوپ نوری حاوی لنز میکرومتر، کلیه داده‌ها ثبت شده و اطلاعات توسط نرم‌افزار آماري SPSS17 آزمون آماری Tukey و Duncan مورد سنجش قرار گرفتند.

نتایج

مشاهدات میکروسکوپی نشان دهنده‌ی توقف سیکل جنسی موش، کاهش اندازه رحم و چسبندگی شدید دیواره‌های رحمی همراه با انسداد کامل لومن داخل رحمی در تمامی نمونه‌های گروه تجربی با دوز تزریقی ۳۰۰ mg/kg.bw از عصاره آبی گیاه افدرا ماژور، در مقایسه با سایر گروه‌ها بود (تصویر ۲).

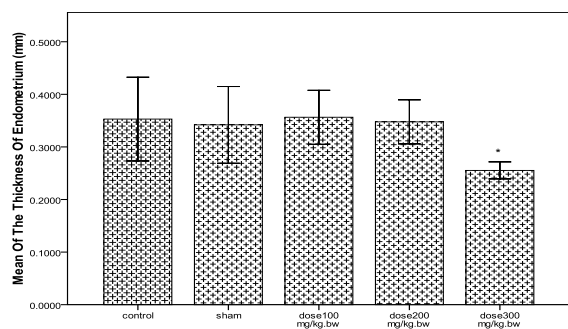
شناسی دانشگاه کرج و تبریز، مورد شناسایی و تأیید قرار گرفته و گونه آن (*Ephedra major*) مشخص گردید.
 پس از جمع آوری گیاه، با حذف ساقه‌های پیر و ریشه‌ها، ساقه‌های جوان از هم جدا شده، در دمای اتاق و در سایه به مدت دو هفته خشک گردیدند. سپس پودر گیاه توسط آسیاب برقی تهیه شد.
 میزان ۱ گرم از پودر گیاه، درون ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل در حال جوش اضافه گردید. سوسپانسیون حاصل به آهستگی به مدت یک ساعت جوشانده شده و جهت خالص سازی و به منظور به دست آوردن یک محلول شفاف، توسط قیف بوختر تحت شرایط خلأ با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف گردید.
 در نهایت محلول به دست آمده تا رسیدن به حجم ۲۰ میلی‌لیتر، مورد تغلیظ قرار گرفت که در طی آن در هر میلی‌لیتر از محلول تهیه شده عصاره آبی، ۵۰ میلی‌گرم پودر گیاه موجود بود.
 موش‌ها از موسسه سرم و واکسن سازی حصارک رازی کرج تهیه و به مدت ۲ هفته جهت آداپتاسیون در اتاق حیوانات دانشگاه کرج (تحت پریرود نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای 22 ± 2 C⁰ و رطوبت RH ۴۰-۵۰٪) نگهداری گردیدند.
 پس از تعیین LD 50 به میزان ۳/۱ g/kg/b.w، با در نظر گرفتن دوز آستانه‌ای، دوزهای مختلف این عصاره برای انجام تزریقات درون صفاقی، طی ۸ روز متوالی به موش‌های



تصویر ۲. رحم کنترل در مرحله مت استروس (سمت راست). رحم تجربی با دوز ۳۰۰ mg/kg.bw (سمت چپ). (بزرگنمایی ۴۰×)

P=پری متر M=میومتر En=آندومتر E=پی‌تلیوم Sg=غدد ترشچی L=لومن V=رگ

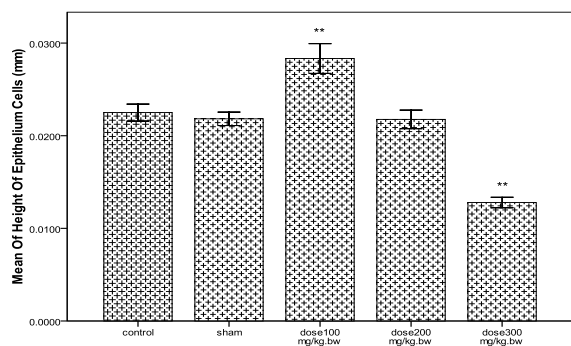
ضخامت آندومتر در دوز تزریقی ۳۰۰ mg/kg.bw نسبت به گروه کنترل، شاهد و سایر گروه‌های تجربی دارای کاهش معناداری ($P < 0.05$) بود (تصویر ۵).



تصویر ۵. مقایسه ضخامت لایه آندومتر گروه‌های تجربی با گروه‌های کنترل، شاهد

* = بیانگر $P < 0.05$

همچنین با اندازه‌گیری ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم، معلوم گردید که دوزهای مختلف عصاره، سبب ایجاد اثرات متفاوتی شده؛ به گونه‌ای که در دوز ۱۰۰ mg/kg.bw، سبب افزایش معنادار ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم ($P < 0.001$)، در دوز ۲۰۰ mg/kg.bw، بدون ایجاد هیچگونه تغییری نسبت به گروه کنترل و شاهد؛ و در دوز ۳۰۰ mg/kg.bw، سبب کاهش معنادار ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم ($P < 0.001$) شده بود (تصویر ۶).

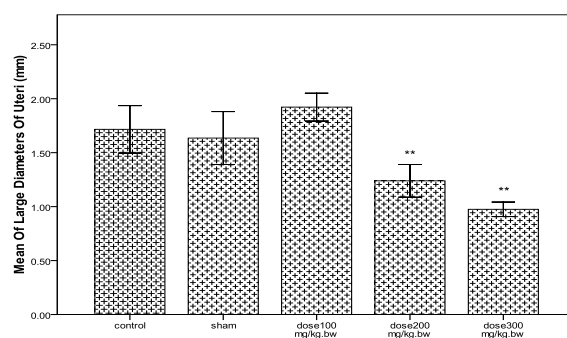


تصویر ۶. مقایسه ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم رحم گروه‌های

تجربی با گروه کنترل و شاهد

* = بیانگر $P < 0.001$

اندازه‌گیری قطر بزرگ رحم نشان دهنده کاهش معنادار در دوز تزریقی ۳۰۰ mg/kg.bw و ۲۰۰ mg/kg.bw ($P < 0.001$) و افزایش در دوز تزریقی ۱۰۰ mg/kg.bw (غیرمعنادار) بود (تصویر ۳).

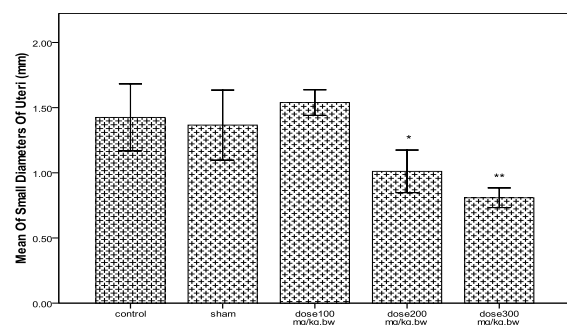


تصویر ۳. مقایسه قطر بزرگ رحم گروه‌های تجربی با گروه

کنترل و شاهد

* = بیانگر $P < 0.001$

اندازه‌گیری قطر کوچک رحم نشان‌دهنده کاهش معنادار آن در دوز تزریقی ۳۰۰ mg/kg.bw ($P < 0.001$) و ۲۰۰ mg/kg.bw ($P < 0.05$) و افزایش در دوز تزریقی ۱۰۰ mg/kg.bw (غیرمعنادار) بود (تصویر ۴).



تصویر ۴. مقایسه قطر کوچک رحم گروه‌های تجربی با گروه

کنترل و شاهد

* = بیانگر $P < 0.001$ * = بیانگر $P < 0.05$

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به مشاهدات میکروسکوپی مربوط به دوز تزریقی 300 mg/kg.bw که نشان دهنده کاهش اندازه رحم و ایجاد چسبندگی شدید و انسداد لومن رحم بود (تصویر ۲) و با توجه به اینکه آسیب لوله‌ای، انسداد و یا چسبندگی شامل اندومتر یوز با شواهد چسبندگی لوله‌ای و یا صفاقی و ... از عوامل اصلی دخیل در ناباروری می‌باشند (۳ و ۱۱) بنابراین احتمال می‌رود که این دوز سبب ایجاد و افزایش ناباروری رحمی در زنان بشود.

نتایج ما در مورد کاهش معنادار قطر بزرگ و کوچک رحمی در دوز 300 mg/kg.bw و 200 mg/kg.bw با نتایج Marcelo همخوانی دارد. Marcelo بیان کرد که استفاده از افدرا سبب کاهش مایع درون ارگانی، حجم ارگان‌ها و رطوبت بافت‌های کلیه، آدرنال، کبد و رحم می‌شود (۶).

افزایش قطر بزرگ و کوچک رحم و همچنین ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم در دوز تزریقی 100 mg/kg.bw ، احتمالاً نشان دهنده افزایش توان باروری رحم در این دوز تزریقی می‌باشد. زیرا یکی از عوامل افزایش توان باروری در افراد افزایش ارتفاع سلول‌های اپی‌تلیوم و متعاقب آن افزایش ضخامت رحم می‌باشد (۳ و ۱۱).

دوز تزریقی 300 mg/kg.bw نسبت به گروه کنترل و شاهد بیانگر کاهش معناداری ($P < 0.05$) در اندازه ضخامت آندومتر بود (تصویر ۵). از آنجایی که در یک سیکل قاعدگی طبیعی، دوره‌های متعدد انقباض شریان‌های ماریچی رحم سبب قطع جریان خون و ایجاد ایسکیمی، و منجر به مرگ دیواره‌ها و ریزش بخش عملکردی لایه آندومتر می‌شود (۱۰)؛ احتمالاً می‌توان کاهش شدید لایه آندومتر در دوز 300 mg/kg.bw را به علت خاصیت انقباض عروقی گیاه افدرا دانست.

شواهد نشان دهنده احتمال افزایش توان باروری رحم در دوز 100 mg/kg.bw و کاهش توان باروری در دوز 300 mg/kg.bw می‌باشد. بنابراین متناسب با دوز مصرفی، گیاه افدرا مازور دارای اثرات دو جانبه‌ای

بوده که می‌تواند دارای مصارف پزشکی فراوانی باشد. مطالعات تکمیلی به منظور شناسایی دقیق بهترین دوز موثره جهت افزایش باروری رحمی این گیاه در دوزهای پایین‌تر از 100 mg/kg.bw در موشهای ماده و همچنین مطالعاتی در رابطه با مکانیسم باروری یا ضدباروری این گیاه روی موش‌های نر توصیه می‌گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه عوامل و همکاران محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج به خاطر فراهم نمودن امکانات اجرای این پژوهش اعلام می‌دارند.

References

1. Bahrnik, Z. (2002) Study on phytology and ecology specification of different species of Ephedra genus in Iran. Journal of medicinal plants researches 317(18) 43-52 (text in Persian).
2. Chee, K.C., Ayu, S.M., Foong K.O. (2012) Herbs on exercise and sports. Journal of Physiological anthropology 31(4)2-7 .
3. Davar-tanha, F., Pormatroud, E. (2012) Berk & Novak's Gynecology. Artin teb, 2 415-446 (text in Persian).
4. Ho-Jun, K., Jung-Mi, P., Jin-Ah, K., Byeong-Pyo, K. (2008) Effect of herbal Ephedra sinica and Evodia rutaecarpa on body composition and resting metabolic rate: A randomized, double-blind clinical trial in korean premenopausal women. Journal of Acupuncture and Meridian Studies 1(1) 128-138.
5. Ik-Soo, K., Young-Jun, P., Sung-Jin, Y., Hee-Bong, L. (2010) Ephedrannin A and B from roots of Ephedra sinica inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators by suppressing nuclear factor- κ B activation in RAW 264.7 macrophages 10 1616-1625.
6. Marcelo, D.A., Marcia, T.F., Elisa, R.L., Solange, C.G., Viviane, C.S., Mirna, B.L., Eliane, D. (2009) Screening for in vivo (anti)estrogenic activity of ephedrine and p-synephrine and their natural sources Ephedra sinica Stapf. (Ephedraceae) and Citrus aurantium L. (Rutaceae) in Rats. Archives of Toxicology 83 95-99.
7. Moattar, F. (1994) Study of herbal medicine used in disease treatment in study center of Isfahan university of medical science to formulation and traditional medicine. herbal treatment and making herbal drug 4(1) 34.
8. Patel, DK., Prasad, SK., Kumar, R., Hemalatha, S. (2012) An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. Elsevier, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 320-330.
9. Ping, li., Chuanyao, T., James, C. (1996) Pregnancy and Ephedrine Increase the Release of Nitric Oxide in Ovine Uterine Arteries. International Anesthesia Research Society 82 288 -293.
10. Ramzi, D. (2005) Joun koura histology. Nore danesh 190-196 (text in Persian).
11. Stanley, C., David, A.Ch., Helmut, F., Maria, M.S., Alvin, N.S. (2001) New observation on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). American Journal of Botany 88(7) 1199-1208.
12. Sadler, T.W. (2011) Langman's Medical Embryology, 11th ed.
13. Torabzadeh, P., Panahi, P. (2011) Evaluation of Antifungal Activity of Physalis alkekengi L. Extracts on Microsporum canis, Candida albicans, Trichophyton mentagrophytes and Nocardia asteroides. American-Eurasian Journal of Agriculture & Environment Science 11 863-866.
14. Vessal, M., Mehrani HA., Omrani, GH. (1991) Effect of an aqueous extract of Physalis alkekengi fruits on estrus cycle, reproduction and uterine creatine kinase BB-isozyme in rats. Journal of Ethnopharmacology 34 69-78.

