نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۶، شماره ۳، صفحه ۴۳۷-۴۲۹ (۱۳۹۹)
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2020.342460.2757
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0905.1398.36.429.101.3.1576.1610

بررسی اثرهای عصاره گیاه *Ruta graveolens* L. بر DNA اسپرم، لقاح و مراحل اولیه رشد جنین موش سوری در محیط آزمایشگاهی

قدرت عبادی مناس*[1] و غلامرضا نجفی[2]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران
پست الکترونیک: ebadimanas@gmail.com
۲- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۹

چکیده

امروزه به‌دلیل عوارض زیاد داروهای شیمیایی، بیشتر مردم به طب سنتی روی آورده و تعداد زیادی از گیاهان را مورد استفاده قرار می‌دهند. یکی از گیاهان دارویی که در طب سنتی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد، سداب (*Ruta graveolens* L.) نام دارد. عصاره این گیاه به‌دلیل ترکیب‌های متنوع با خواص بیولوژیکی متفاوت، عوارض مختلفی بر سلول‌های بدن دارد. هدف این مطالعه بررسی اثرهای عصاره گیاه سداب بر DNA اسپرم‌ها، لقاح و مراحل اولیه رشد جنین در موش‌های کوچک سفید آزمایشگاهی است. در این مطالعه، ۲۰ موش کوچک سفید آزمایشگاهی نر بالغ سالم با وزن تقریبی ۳±۲۵ گرم مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه آزمایش دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره آبی گیاه سداب در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر و گروه کنترل ۰/۲ میلی‌لیتر نرمال سالین را روزانه به مدت ۴۵ روز از طریق دهانی دریافت نمودند. داده‌های حاصل از مطالعه به روش ANOVA تجزیه‌وتحلیل آماری شد. نتایج نشان داد پارامترهای اسپرمی ازجمله تعداد اسپرم‌ها، قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها به‌علاوه پارامترهای جنینی ازجمله اووسیت‌های لقاح یافته، جنین دوسلولی، تعداد بلاستوسیست‌های گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) کاهش یافته است. اما درصد اسپرم‌های نابالغ و شکستگی در DNA اسپرم‌های گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) افزایش یافته بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه سداب موجب کاهش پارامترهای اسپرمی و کاهش پارامترهای جنینی می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آسیب DNA، اسپرم، *Ruta graveolens* L.، رشد جنین، موش.

مقدمه

در عصر حاضر ناباروری یکی از مشکلاتی است که حدود ۲۰-۱۵٪ زوج‌ها در سن تولیدمثلی به آن مبتلا می‌شوند. تقریباً ۵۰٪ این جمعیت را مردان تشکیل می‌دهند. دلیل کاهش باروری جمعیت مردان و به‌تبع آن کاهش توان تولیدمثلی آنها به دلیل کاهش تعداد اسپرم در مردان است که تعداد آن از ۱۱۳ میلیون در میلی‌لیتر در سال ۱۹۴۰ به ۶۶ میلیون در میلی‌لیتر در سال ۱۹۹۰ رسیده است (Suzuki & Sofikitis, 1999). عوامل زیادی در این اختلال نقش دارند. یکی از مهمترین آنها فاکتورهای محیطی ازجمله گیاهان سمی، داروها و ترکیب های

شـــیمیایی مـــی‌باشـــد (Schlegel *et al.*, 1991). امروزه به‌دلیل عوارض زیاد داروهای شیمیایی، مردم به طب سنتی روی آورده انـد و تعـداد زیـادی از گیاهـان را مـورد استفاده قرار می‌دهند. بنابراین مطالعه اثرهای آنها مـی‌توانـد خیلـی مفیـد بـرای مصـرف‌کننـدگان باشـد (Estrella & Picasso, 1995). یکی از گیاهان دارویی که در طب سـنتی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد، سداب نام دارد (Zargari, 1996). ارزش درمانی این گیاه به قدری زیاد است که از آن به‌عنوان درمان‌کننده «جمیع بیماری‌ها» نام برده شـده اسـت (Heidari *et al.*, 2005). سداب گیاهی با نام علمـی *Ruta graveolens* از خـــانواده گیاهـــان Rutaceae اســـت (Ghahraman, 1993). این گیاه به‌عنوان دارویی برای پیش انداختن عادت ماهانه و سقط جنین در زنان مـورد اسـتفاده قرار می‌گیرد (Kong *et al.*, 1989؛ Ciganda & Laborde, 2003). از سداب همچنین برای درمان التهاب بافت‌ها، تـب، انگـل و تحریـک‌پـذیری نیـز اسـتفاده مـی‌شـود (Atta & Guarrera, 1999؛ Alkofahi, 1998).

عصاره گیاه سداب ترکیب‌های متنوعی ازجمله متوکسالین، کوئرستین، روتین، گزاتوتوکسین و برگابتن دارد که هر یک خواص بیولوژیکی متفاوتی دارند. متوکسالین موجب کاهش استرادیول در خون و به‌دنبال آن کاهش لقاح، کاهش تخمک‌گذاری، کاهش لانه‌گزینی و کاهش وزن می‌شود (Diawar & Trumbel, 1996؛ Suchar *et al.*, 1996). کوئرستین و روتین بر روی ترکیب‌های شیمیایی سرطان‌زا خاصیت بازدارندگی دارند. کوئرستین با فعالیت ضدتکثیری خود از رشد سلول‌های جلوگیری کرده و به‌عنوان پروآپوپتوز عمل می‌کند (Deschner *et al.*, 1991). همچنین کوئرستین با اثر مهاری بر تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌های آندوتلیال طی فرایند آنژیوژنز بر تکامل فولیکول‌ها در جنس ماده تأثیر می‌گذارد (Stochmalov *et al.*, 2013). ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سداب به‌دلیل اثرهای سیتوتوکسیک و هپاتوتوکسیکی خود با برخی پروتئین‌های انتقال‌دهنده هورمون‌ها واکنش و موجب غیرفعال شدن بعضی از آنزیم‌ها می‌شوند که نتیجه آن تغییر غلظت بافتی هورمون‌ها ازجمله استروئیدها و پروستاگلاندین‌ها است (Parray *et al.*, 2012). ترکیب‌های گزاتوتوکسین و برگابتن موجود در عصاره سداب نیز موجب کاهش زاد و ولد، تعداد محل‌های لانه‌گزینی جنین و وزن موش می‌شود (Diawara *et al.*, 1999).

اغلب مردم که به‌طور سنتی از این گیاه استفاده می‌کنند اطلاعات کافی در مورد عوارض جانبی احتمالی آن در زمینه توان باروری ندارند. تحقیقاتی نیز در این زمینه انجام نشده است. بنابراین به دلیل اهمیت عوارض احتمالی استفاده بی‌رویه گیاه سداب، در این پژوهش به بررسی اثرهای عصاره آبی گیاه سداب بر توان باروری آزمایشگاهی موش نر پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

حیوانات

در این تحقیق آزمایشگاهی، ۲۰ موش سوری نر نژاد Balb/C بالغ کاملاً سالم با وزن تقریبی ۳±۲۵ گرم از حیوان‌خانه گروه زیست‌شناسی دانشگاه ارومیه تهیه و استفاده گردید. قبل از شروع آزمایش برای سازش موش‌ها با محیط آزمایشگاهی به مدت یک هفته در حیوان‌خانه نگهداری شدند. موش‌ها در طول تحقیق از کنسانتره مخصوص تغذیه می‌کردند و از شیشه‌های مخصوص آب می‌نوشیدند. میزان نور حیوان‌خانه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، درجه حرارت ۲۰-۲۳ درجه سانتی‌گراد بود که در طول آزمایش به‌شدت کنترل می‌شد. تمام آزمایش‌ها مطابق قوانین کمیته نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه (۵۰۲۰۱/۵۰۹/۲۴۰) انجام شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه ۱۰تایی تقسیم شدند. گروه آزمایش روزانه دوز ۳۰۰ mg/kg عصاره آبی گیاه سداب فرموله شده در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر و گروه کنترل روزانه ۰/۲ میلی‌لیتر نرمال سالین را به‌مدت ۴۵ روز از طریق دهانی دریافت نمودند.

عصاره‌گیری از گیاه سداب

گیاه سداب تهیه شده، بعد از تأیید در دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه (شماره هرباریوم ۵۹۳۱)، توسط آسیاب برقی خرد گردید. سپس در ظرف‌های جداگانه، مقدار ۱۰۰ گرم از پودر در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر نرمال سالین حل و در دمای اتاق روی دستگاه شیکر به‌مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. آنگاه محلول موجود را چند بار از صافی عبور داده، بعد از آن مایع بدست‌آمده با دور RPM ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری گردید و در دمای اتاق تبخیر شد. بعد از تبخیر، عصاره‌ای به رنگ قهوه‌ای تیره بدست آمد. عصاره حاصل را در ظرف دربسته‌ای قرار داده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید. قبل از شروع دوره محلول عصاره آبی سداب با غلظت mg/kg ۳۰۰ در ۰/۲ میلی‌لیتر تهیه گردید و در یخچال نگهداری شد (Halvaei *et al*., 2012).

تهیه اسپرم

پس از پایان دوره آزمایش، هر موش طبق قوانین کمیته آزمایشگاه دانشگاه ارومیه با تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) آسان‌کُشی شد. در زیر استرئومیکروسکوپ (مدل اولیمپوس TL_2) اسپرم‌ها از قسمت دم اپیدیدیم بدست آورده شد. قسمت دم اپیدیدیم هر دو بیضه موش استخراج و در یک میلی‌لیتر محیط کشت HTF+4 mg/ml BSA در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ قرار داده شد. بافت اپیدیدیم خرد و اسپرم‌ها از بافت آزاد شدند.

تعداد اسپرم‌ها و قابلیت زنده بودن آنها

ذخایر اسپرم دم اپیدیدیم با استفاده از لام هموسیتومتری استاندارد تعیین شد (Suzuki & Sofikitis, 1999). زنده ماندن اسپرم‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ائوزین–نگروزین انجام گردید. به این ترتیب که ده میکرولیتر از هر نمونه اسپرمی تهیه شده بر روی اسلاید قرار گرفت و با ده میکرولیتر ائوزین–نگروزین رنگ‌آمیزی شد. اسپرم‌های زنده (سر اسپرم بدون رنگ) و مرده (سرهای قرمز رنگ) ارزیابی شد.

ارزیابی کروماتین اسپرم

برای ارزیابی آسیب‌های کروماتین هسته اسپرم که مربوط به مقدار نوکلئوپروتئین همراه DNA آنهاست از رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو استفاده شد. آنیلین‌بلو به‌طور اختصاصی با قسمت لیزین پروتئین هیستون هسته‌ای واکنش و تفاوت‌های موجود را در ترکیب پروتئین هسته‌ای اصلی اسپرم نشان می‌دهد. هیستون اسپرم‌های نابالغ سرشار از لیزین هستند در نتیجه رنگ آبی به‌خود می‌گیرند. از سویی هیستون اسپرم‌های بالغ سرشار از آرژینین و سیستئین هستند، ازاین‌رو لیزین کمی دارند و رنگ آبی به‌خود نمی‌گیرند (Nasr-Esfahani *et al*., 2001). یک قطره از مایع اسپرمی تهیه شده روی اسلایدهای شیشه‌ای پخش شد. پس از خشک شدن تمام اسمیرها به‌مدت ۳۰ دقیقه در گلوتارآلدئید ۳٪ بافر ثابت شدند. سپس اسلایدها با آنیلین‌بلو آبی ۵٪ رنگ‌آمیزی و با اسید استیک ۴٪ (pH=۳/۵) ترکیب و به‌مدت ۷ دقیقه ترکیب و بعد با میکروسکوپ نوری ارزیابی شد.

ارزیابی آسیب DNA اسپرم‌ها

قطره مایع اسپرمی روی اسلایدهای شیشه‌ای پخش شد. سپس منتظر شدیم تا اسمیرها خشک شوند. تمام اسمیرها در متانول/اسید استیک (۳:۱) تثبیت شدند. سپس اسلایدها با محلول ۱۹٪ آکریدین ـ اورنج در سیترات فسفات به‌مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی گردیدند. اسپرم‌ها با میکروسکوپ فلورسانس (مدل GS_7، نیکون، ژاپن) با عدسی x۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند. سه نوع الگوی رنگ‌آمیزی مشخص شد، اسپرم‌های سبز رنگ (DNA دو رشته‌ای)، اسپرم‌های قرمز و زرد (DNA تک رشته‌ای) (Moustafa *et al*., 2004).

تخمک‌گیری و قابلیت باروری آزمایشگاهی

موش‌های گروه کنترل و تجربی برای گرفتن اووسیت‌های بالغ تحت تحریک تخمدانی قرارگرفتند. برای انجام این مطالعه تزریق ۱۰ واحد هورمون PMSG (pregnant Mare serum Gonadotropin) (sigma, G_{5644}) و ۴۸-۴۶ ساعت بعد تزریق ۱۰ واحد HCG (Human Chorionic Gonadotropin) (Sigma, C_{2056}) به روش داخل صفاقی انجام شد. عمل تخمک‌گذاری معمولاً ۲۴- ۱۲ ساعت پس از تزریق HCG انجام می‌شود. بین ۱۲-۱۰ ساعت پس از تزریق HCG (صبح روز بعد) بعد از آسان‌کُشی حیوان به‌وسیله تزریق داخل صفاقی مخلوطی از کتامین (۱۰۰mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg)، لوله‌های رحمی جدا شدند و قسمت آمپولا جدا و در ظرف پتریدیش حاوی محیط کشت HTF + 4mg/kg BSA گذاشته شد. با استفاده از تکنیک Dissecting، تخمک‌ها خارج و به محیط کشت انتقال داده شدند. میکرو قطره‌های محتوای اسپرم‌های سالم (۱× $۱۰^{۶}$ (Sperm/ml)) در محیط کشت HTF + 4mg/kg BSA تهیه شدند. ۱۰ تا ۱۵ اووسیت در هر میکرو قطره قرار داشت. بعد از حدود ۶-۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ فرایند لقاح انجام شد. اووسیت‌های لقاح یافته برای ادامه تقسیمات زیگوت به قطره‌های محیط HTF + 4mg/kg BSA تازه‌ای منتقل شدند. روی تمامی قطرات با روغن معدنی مخصوصی (sigma m_{8410}) پوشیده شد. اووسیت‌های لقاح یافته از روی جسم قطبی از لقاح نیافته به‌وسیله میکروسکوپ اینورت با درشت‌نمایی x۲۰۰ تشخیص داده می‌شد. بعد از لقاح آزمایشگاهی زیگوت‌ها سه دفعه با محیط KSOM (potassium simplex optimized medium) شستشو داده شدند. سپس به محیط KSOM جدیدی منتقل گردیدند. به‌مدت ۵ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO_2 قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت از کشت زیگوت جنین دو سلولی و در روز پنجم مرحله بلاستوسیت به‌وسیله میکروسکوپ کنتراست قابل مشاهده بود.

تجزیه‌وتحلیل‌های آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری کلیه داده‌ها با روش آنوا (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها در $P<۰/۰۵$ با در نظر گرفتن انحراف معیار (SE) انجام گردید.

نتایج

تعداد و مورفولوژی اسپرم‌ها

این نتایج نشان داد که تعداد اسپرم‌های گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش یافته است (جدول ۱).

رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو برای بررسی بلوغ هسته اسپرم نشان داد که اسپرم‌های با هسته نابالغ (هسته‌های به رنگ آبی) در گروه سداب نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) افزایش یافته است. همچنین قطرات سیتوپلاسمی در اسپرم‌های نابالغ مشاهده شد (شکل ۱- a).

رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین برای بررسی اسپرم‌های زنده از مرده نشان داد که تعداد اسپرم‌های مرده که رنگ ائوزین-نگروزین را به‌خود می‌گیرند (اسپرم با سر قرمز) در گروه سداب نسبت به گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) زیاد بود. البته تعداد اسپرم‌های غیر نرمال نیز در گروه آزمایش بیشتر بود (شکل ۱- b).

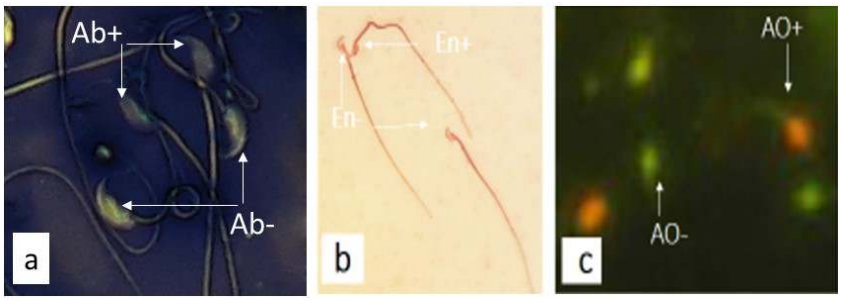
رنگ‌آمیزی آکریدین-اورنج برای بررسی آسیب‌های موجود در ساختار DNA کروماتینی اسپرم‌ها نشان داد که تعداد اسپرم‌ها با شکستگی رشته‌های DNA به‌طور قابل توجهی ($P<۰/۰۵$) در گروه سداب نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (شکل ۱- c). داده‌های مربوط به تعداد اسپرم و موفولوژی آنها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- مقایسه پارامترهای اسپرمی در گروه‌های آزمایش و کنترل (Mean± SE)

پارامترهای اسپرمی	کنترل	آزمایش
تعداد اسپرم ($۱۰^۶$)	۴۹/۲۷±۱/۷۲	۲۶/۸۱±۲/۲۶*
قابلیت زنده بودن اسپرم (ائوزین ـ نگروزین) (٪)	۸۲/۷۴± ۱/۳۶	۵۶/۸۸±۱/۴۷*
اسپرم‌های نابالغ (آنیلین بلو) (٪)	۱۹/۴۴±۱/۰۳	۴۲/۳۱±۰/ ۲۶*
شکستگی DNA (آکریدین اورنج) (٪)	۱۰/۱۵±۰/۱۶	۲۶/۲۵±۱/۰۳*

پارامترهای مختلف اسپرمی گروه سداب و کنترل به‌وسیله آزمون توکی آنالیز شده است.

علامت ستاره (*) نشان‌دهنده معنی‌دار بودن آن نسبت به گروه کنترل است ($P<۰/۰۵$).



شکل ۱- تأثیر عصاره گیاه سداب بر مورفولوژی اسپرم‌ها

a: تصویر اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده با آنیلین‌بلو با درشت‌نمایی ۴۰۰x قابل مشاهده است. Ab^-- اسپرم بالغ به رنگ روشن؛ Ab^+- اسپرم نابالغ به رنگ آبی.

B: تصویر اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده ائوزین-نگروزین با درشت‌نمایی ۲۰۰x قابل مشاهده است. En^-- اسپرم زنده به رنگ روشن؛ En^+- اسپرم مرده به رنگ قرمز.

C: تصویر اسپرم‌های رنگ‌آمیزی شده با آکریدین- اورنج با درشت‌نمایی ۴۰۰x قابل مشاهده است. Ao^-- اسپرم با زنجیره DNA سالم. Ao^+- اسپرم‌های با زنجیره DNA آسیب دیده.

تأثیر سداب بر لقاح و مراحل اولیه رشد جنین

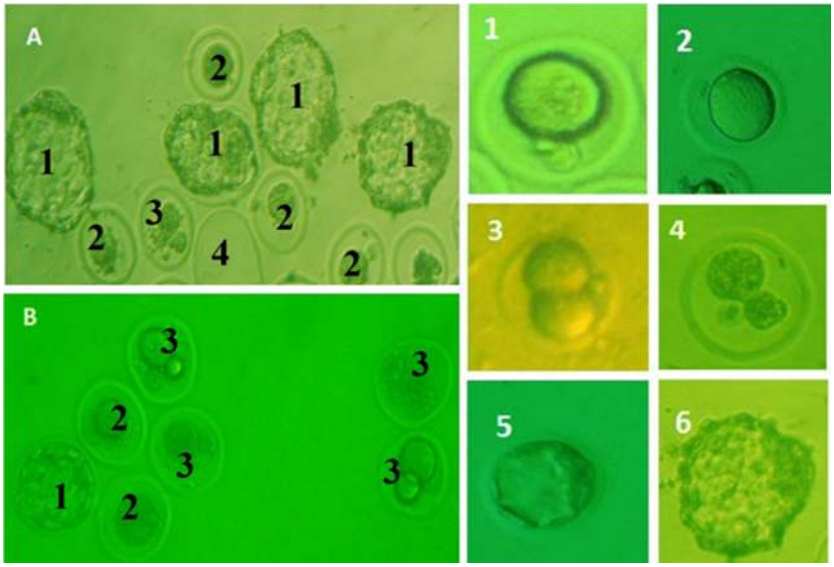
اووسیت‌های لقاح یافته با اسپرم‌های دریافت شده از موش‌های تحت تأثیر سداب نسبت به اووسیت‌های لقاح یافته با اسپرم‌های دریافت شده از گروه کنترل به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) کاهش نشان داد. در گروه سداب در مقایسه با گروه کنترل بیشتر جنین‌ها در مرحله دو سلولی یا چهار سلولی متوقف شده بودند. همچنین نتایج مشخص کرد در گروه سداب نسبت به گروه کنترل تعداد جنین‌هایی که به مرحله بلاستوسیست رسیده بودند به‌صورت قابل توجهی کاهش یافته بود ($P<۰/۰۵$). داده‌های مربوط به تأثیر سداب بر لقاح و مراحل رشد جنین در جدول ۲ و شکل ۲ آورده شده است.

جدول ۲- مقایسه پارامترهای جنین در گروه‌های آزمایش و کنترل (Mean± SE)

پارامترهای جنین	آزمایش	کنترل
اووسیت‌های لقاح یافته (٪)	۵۰/۱۳±۲/۴۲*	۸۵/۵۴±۰/۴۱
جنین دوسلولی (٪)	۴۰/۲۴± ۱/۲۷*	۷۸/۱۴±۱/۳۲
بلاستوسیست (٪)	۳۹/۴۶±۴/۱۴*	۷۹/۳۳±۲/۱۱

پارامترهای مختلف جنینی گروه سداب و کنترل به‌وسیله آزمون توکی آنالیز شده است.

علامت ستاره (*) نشان‌دهنده معنی‌دار بودن آن نسبت به گروه کنترل است ($P<۰/۰۵$).



شکل ۲- تأثیر سداب بر لقاح و مراحل مختلف رشد جنین

A: تعدادی جنین شکفته شده (۱)، اووسیت بارور نشده (۲)، جنین متوقف شده در مرحله دو سلولی (۳) و یک پرده شفاف مربوط به یکی از جنین‌های شکفته شده (۴) در گروه کنترل را نشان می‌دهد. B: یک جنین در مرحله بلاستوسیت با کیفیت نسبتاً خوب و حفره بلاستوسل مشخص (۱)، تعدادی اووسیت بارورنشده و لیز شده (۲)، به‌علاوه تعداد زیادی جنین متوقف شده در مرحله دو سلولی و تکه تکه شده (۳) را در گروه سداب نشان می‌دهد. اشکال منفرد سمت راست: ۱- اووسیت بارور شده، ۲- اووسیت بارور نشده، ۳- جنین سالم دو سلولی، ۴- جنین متوقف شده در مرحله دو سلولی، ۵- بلاستوسیست، ۶- جنین شکفته شده

بحث

انسان در عصر جدید به‌دلیل وجود عوارض جانبی زیاد داروهای شیمیایی در درمان بیماری‌ها، به طب سنتی به‌ویژه گیاه درمانی روی آورده است. استفاده از گیاهان روز به روز بیشتر شده است. گیاه سداب نیز از زمان قدیم برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. ترکیب‌های متنوع موجود در این گیاه در برخی مواقع به‌دلیل استفاده زیاد از آن عوارض جانبی به‌همراه داشته است. بنابراین نیاز به تحقیقات در مورد عوارض احتمالی استفاده از این گیاه احساس می‌شود. ازاین‌رو هدف این مطالعه بررسی تأثیر عصاره آبی گیاه سداب بر پارامترهای مختلف اسپرمی، لقاح و مراحل اولیه رشد جنین در موش‌های سوری آزمایشگاهی است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تعداد اسپرم‌های موش‌های تحت تأثیر عصاره گیاه سداب نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است، دلیل احتمالی آن وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سداب است. این ترکیب‌ها با اثر منفی روی بافت بینابینی بیضه، موجب کاهش تولید هورمون تستوسترون، آن هم منجر به کاهش اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم‌ساز شده است. براساس گزارش Parray و همکاران (۲۰۱۲)، ترکیب‌های فلاونوئیدی در اثر واکنش با پروتئین‌های انتقال دهنده هورمون‌ها، موجب غیرفعال شدن آنزیم‌های دخیل در سنتز هورمون تستوسترون شده است که مطابق نتایج این تحقیق است.

در طی فرایند اسپرماتوژنز، برای تبدیل اسپرم‌های نابالغ به بالغ، کروماتین اسپرم ضرورتاً تغییر وضعیت داده و متراکم‌تر می‌شود. DNA هسته‌ای از حالت نوکلوزوم متصل به هیستون به ساختار مارپیچی غنی از پروتامین تغییر شکل می‌دهد تا DNA را در برابر عوامل خارجی نامناسب مقاوم کند (Toshimori, 2009). پروتئین‌های هیستون حاوی تعداد زیادی از اسیدآمینه لیزین بوده که به‌رنگ اسیدی آنیلین‌بلو متصل شده، در نتیجه اسپرم نابالغ به رنگ آبی مشاهده می‌گردد اما اسپرم‌های بالغ به‌دلیل داشتن مقادیر زیادی اسیدآمینه آرژین و سیستئین در پروتامین و عدم اتصال آنیلین‌بلو به آنها، رنگ آنیلین‌بلو به خود نمی‌گیرند.

یافته این تحقیق نشان داد که بعد از تأثیر عصاره گیاه سداب بر موش‌های گروه آزمایش، میزان اسپرم‌های نابالغ به‌شدت افزایش یافته و رنگ آنیلین‌بلو را به خود گرفته است که دلیل احتمالی آن، ناشی از تأثیر کومارین‌های عصاره گیاه سداب بر روی کانال‌های پتاسیمی اسپرم و در نتیجه مانع از پروتامینه شدن DNA در هسته اسپرم‌ها است. Naghibi Harat و همکاران (۲۰۰۷)، در بررسی تأثیر کومارین‌ها بر تحرک اسپرم انسان گزارش کردند که کومارین‌ها با بلوکه کردن کانال‌های پتاسیمی در اسپرم مانع بلوغ آنها می‌شود و در راستای یافته این تحقیق است.

همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد اسپرم‌های مرده در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته است. با توجه به اینکه ترکیب‌های فلاونوئیدی موجود در عصاره گیاه سداب خاصیت سیتوتوکسیک دارد با اثر بر روی غشای اسپرم موجب آسیب دیدن آن و از بین رفتن سلول شده است. همسو با این نتیجه Ivanova و همکاران (۲۰۰۵)، با بررسی اثرهای عصاره گیاه سداب بر باکتری‌های مختلف، خاصیت سیتوتوکسیتی و کشندگی آن را گزارش کرده‌اند.

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی آکریدین–اورنج نشان داد که میزان آسیب DNA کروموزوم‌های اسپرمی گروه سداب نسبت به گروه کنترل بیشتر است. وجود اسپرم با DNA آسیب دیده ممکن است نتیجه اختلال در بسته‌بندی کروماتین و یا نشان‌دهنده آپوپتوز باشد. مطابق با این یافته Fadlalla و همکاران (۲۰۱۱)، با بررسی تأثیر عصاره گیاه سداب بر سلول‌های سرطانی نشان دادند که عصاره گیاه سداب باعث ایجاد مسیرهای آسیب DNA در سلول‌های سرطانی شده و از تکثیر و بقایای سلول سرطانی جلوگیری می‌کند.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داده که در گروه سداب نسبت به گروه کنترل درصد اووسیت‌های لقاح یافته، جنین‌های دوسلولی و بلاستوسیست کاهش یافته است. کاهش میزان لقاح اووسیت‌ها به‌دلیل از بین رفتن یکپارچگی DNA اسپرم‌ها، افزایش اسپرم‌های نابالغ، کاهش تحرک اسپرم‌ها و در نتیجه به کاهش کیفیت محتوای اسپرم‌ها مربوط می‌شود. البته گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد هر اختلال که منجر به عدم بلوغ اسپرم‌ها در اپیدیدیم بیضه شود، باعث اختلال در توانایی لقاح اسپرم می‌شود (Kessopoulou *et al.*, 1992). عدم توانایی جنین به زنده ماندن و ادامه مراحل رشد به وجود آسیب در DNA سلول‌های جنین مربوط می‌شود که منشأ آن اسپرم‌های آسیب دیده است (Evenson *et al.*, 1999). در تأیید این یافته Gutierrez-Pajares و همکاران (۲۰۰۳)، با بررسی اثرهای عصاره گیاه سداب بر رشد جنین موش سوری گزارش کردند که عصاره گیاه سداب به‌دلیل داشتن آلکالوئیدهای گیاهی موجب آسیب DNA اسپرم و در نتیجه کاهش لقاح و لانه‌گزینی جنین در رحم شده است.

بنابراین باتوجه به نتایج این تحقیق چنین استنتاج می‌گردد که عصاره گیاه سداب به‌دلیل داشتن ترکیب‌های کومارینی و فلاونوئیدی، بر پارامترهای مختلف اسپرمی و مراحل اولیه رشد جنین در موش آزمایشگاهی اثرهای سیتوتوکسیک و مهاری داشته و منجر به کاهش باروری در موش‌های کوچک آزمایشگاهی شده است.

هرچند ارزش درمانی این گیاه به قدری زیاد است که از آن در طب سنتی به‌عنوان درمان کننده همه بیماری‌ها نام برده شده است. اما به‌دلیل وجود ترکیب‌های شیمیایی پیچیده و پرتعداد در عصاره این گیاه، هنوز سازوکار دقیق این اثرها ناشناخته باقی مانده است. به‌علاوه اینکه مطالعات میکروسکوپ الکترونی و بررسی ژن‌های دخیل در این زمینه برای یافتن سازوکار اثر این عصاره خیلی کمک کننده است. از سویی با وجود شواهدی مبنی بر سمی بودن این گیاه و بروز اثرهای جانبی، هنوز از نظر سم‌شناسی هیچ مطالعه‌ای برای یافتن راه مقابله با عوارض جانبی آن انجام نشده است.

منابع مورد استفاده

- Atta, A.H. and Alkofahi, A., 1998. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. Journal of Ethnopharmacology, 60: 117-124.
- Ciganda, C. and Laborde, A., 2003. Herbal infusions used for induced abortion. Clinical Toxicology, 41: 235-239.
- Deschner, E., Ruperto, R., Wong, G. and Quercetin, H.L., 1991. Rutin as inhibitors of azoxymethanol-

Bolton, A.E. and Cooke, I.D., 1992. Origin of reactive oxygen species in human semen spermatozoa or leukocytes. Journal of Reproduction & Fertility, 94(2): 463-470.
- Kong, Y.C., Lau, C.P., Wat, K.H., Ng, K.H., But, P.P., Cheng, K.F. and Waterman, P.G., 1989. Antifertility principle of *Ruta graveolens*. Planta Medica, 55(2): 176-178.
- Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J. and Agarwal, A., 2004. Relationship between ROS roduction, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Human Reproduction, 19(1): 129-138.
- Naghibi Harat, Z., Sadeghipour, H., Sadeghi, M., Kamalinejad, M. and Eshraghian, M., 2007. Coumarines effect on human sperm motility. In 14th annual meeting of Middle East fertility society. Antalya-Turkey: Middle East Fertility Society, 7(4): 367-374.
- Nasr-Esfahani, M.H., Razavi, S. and Mardani, M., 2001. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 18(4): 219-225.
- Parray, S.A., Bhat, J., Ahmad, G., Jahan, N., Sofi, G. and IFS, M., 2012. *Ruta graveolens*: from traditional system of medicine to modern pharmacology: an overview. American Journal of PharmTech Research, 2: 239-252.
- Schlegel, P.N., chacg, T.S. and Marshall, F.F., 1991. Antibiotics: potential hazards to male fertility. Fertility and Sterility, 55(2): 235-242.
- Stochmalov, A., Sirotkin, A., Kdasi, A. and Alexa, R., 2013. Physiological and medical effects of plant flavonoid quercetin. The Journal of Microbiology. Biotechnology and Food Sciences, 2: 1915-1926.
- Suchar, L.A., Chang, R.L., Thomas, P.E., Rosen, R.T., Lech, J. and Conney, A.H., 1996. Effects of phenobarbital, dexamethazone, and 3-methylcholanthrene administration on the metabolism of 17-beta-estradiol by liver microsomes from female rats. Endocrinology, 137: 663-679.
- Suzuki, N. and Sofikitis, N., 1999. Protective effects of antioxidants on testicular functions of varicocelized rats. Yonago Acta Medica, 42: 87-94.
- Toshimori, K., 2009. Dynamics of the Mammalian Sperm Head. Advances in Anatomy. Embryology and Cell Biology, vol 204. Springer, Berlin, Heidelberg, 9-50.
- Zargari, A., 1996. Medicinal Plants (Vol. 3). Tehran University Publications, Tehran, 464p.

induced colonic neoplasia. Carcinogenesis, 2: 1193-1196.
- Diawara, M.M. and Trumbel, J.L., 1996. Linear furocoumarins: 175-189. In: D'Mello, J.P.F., (Ed.). Hand Book of Plant and Fungal Toxicants. CRC press, 368p.
- Diawara, M.M., Chavez, K.J., Hoyer, P.B., Williams, D.E., Dorsch, J., Kulkosky, P. and Franklin, M.R., 1999. A novel group of ovarian toxicants: the psoralens. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 13(3-4):195-203.
- Estrella, E. and Picasso, B.M., 1995. Plantas medicinales amazónicas: realidad y perspectivas/Medicinal plants form the Amazon Region: reality and perspectives, Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaría pro tempore, 302p.
- Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., De Angelis, P. and Claussen, O.P., 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Human Reproduction, 14(4): 1039-1049.
- Fadlalla, K., Watson, A., Yehualaeshet, T., Turner, T. and Samuel, T., 2011. *Ruta graveolens* extract induces DNA damage pathways and blocks Akt activation to inhibit cancer cell proliferation and survival. Anticancer Research, 31(1): 233-241.
- Ghahraman, A., 1993. Plant Systematics. Cormophytes of Iran. Nashre Daneshgahi, Tehran, Iran, 752p.
- Guarrera, P.M., 1999. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in central Italy. Journal of Ethnopharmacology, 68(1-3): 183-192.
- Gutierrez-Pajares, J.L., Zuniga, L. and Pino, J., 2003. *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. Reproductive Toxicology, 17(6): 667-672.
- Halvaei, I., Sadeghipour Roodsari, H.R. and Naghibi Harat, Z., 2012. Acute effects of *Ruta graveolens* L. on sperm parameters and DNA integrity in rats. Journal of Reproduction & Infertility, 13(1): 33-38.
- Heidari, M., Ebrahimi, S., Mehrabani, M., Pardakhti, A. and Vafazadeh, J., 2005. Effects of methanolic extract of *Achillea wilhelmsii* C. koch on seizure induced by picrotoxin in mice. Journal of Babol University of Medical Sciences, 7(4): 7-13.
- Ivanova, A., Mikhova, B., Najdenski, H., Tsvetkova, I. and Kostova, I., 2005. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. Fitoterapia, 76: 344-347.
- Kessopoulou, E., Tomlinson, M.J., Barratt, C.L.,

The *in vitro* effects of *Ruta graveolens* L. extract on the sperm DNA, fertilization and early embryonic development in mice

Gh. Ebadimanas[1*] and Gh. Najafi[2]

1*- Corresponding author, Department of Basic Sciences, Farhangian University, Tehran, Iran
E-mail: ebadimanas@gmail.com
2- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

` Received: March 2020 Revised: May 2020 Accepted: May 2020

Abstract

Chemical drugs have many side effects; therefore most people turn to traditional medicine and use a large number of herbs. Rue (*Ruta graveolens* L.) is one of the plants widely used in traditional medicine. The extract of this plant has different effects on body cells due to various compounds with different biological properties. This study was planned to clarify how rue can affect the DNA integrity of sperms, fertilization, and early *in vitro* embryonic development in white mice. In this study, 20 healthy adult male mice weighing approximately 25±3 g were used. Mice were randomly divided into two groups of 10. The experimental group received 300 mg kg^{-1} rue aqueous extract in a volume of 0.2 ml and the control group received 0.2 ml of normal saline orally, daily for 45 days. The results showed that sperm parameters such as number and viability in addition to embryonic parameters such as fertilized oocytes, two-celled embryo, and the number of blastocysts decreased significantly (P<0.05) in the experimental group compared to the control one. However, the percentage of immature sperms and fractures in their DNA increased significantly (P<0.05) in the experimental group, compared to the control one. The results of this study indicated the reducing effect of rue extract on sperm and embryonic parameters.

Keywords: DNA damage, sperm, *Ruta graveolens* L., embryonic development, mice.