مقاله تحقیقی

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره بیستم، شمارهٔ ۱، دی ۱۳۹۶، صفحه ۴۹-۴۳

اثرات عصاره الکلی گل رازک در طی حاملگی و شیردهی بر بلوغ جنسی و برخی شاخصهای تولیدمثلی موشهای سوری نر

رحمت اله پرندین (PhD)[1*]، شهزاد داروگری (MSc)[1]

۱-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور تهران

دریافت:۹۶/۴/۱۷، اصلاح: ۹۶/۷/۲، پذیرش: ۹۶/۹/۲۵

خلاصه

سابقه و هدف: گیاه رازک با خواص استروژنیک بعنوان ماده خام در صنعت ماء الشعیرسازی معروف می باشد. هم اکنون مواجهه با ترکیبات استروژنیک برونزاد در دوره های جنینی و نوزادی نگرانی سلامت عمومی می باشد زیرا ممکن است باعث اختلال در تولیدمثل گردد. لذا این مطالعه بمنظور ارزیابی تیمار رازک در مراحل اولیه زندگی بر آغاز بلوغ و برخی شاخصهای تولیدمثلی موشهای نر انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تعداد ۲۰ سر موش سوری حامله به ۵ گروه ۴ تایی شامل کنترل (بدون تیمار)، شاهد (سالین) و ۳ گروه تحت درمان با عصاره الکلی گل رازک با دوزهای (۵۰،۱۰۰،۱۵۰mg/kg/bw) تقسیم شده و روزانه از روز ۷ بارداری تا ۷ روز پس از تولد بوسیله گاواژ تیمار شدند. سپس تاثیر عصاره الکلی گل رازک بر زمان آغاز بلوغ، وزن بیضه و اپیدیدیم، تعداد، حیات و تحرک اسپرم، غلظت تستوسترون و درصد باروری فرزندان نر ارزیابی شد.

یافته ها: روز آغاز بلوغ در گروه ۱۵۰mg/kg رازک (۴۳/۶±۰/۸۳) در مقایسه با کنترل (۳۹/۸±۰/۴۹) دیرتر اتفاق افتاد (p<۰/۰۱). وزن بیضه و اپیدیدیم در گروه های ۱۰۰ و ۱۵۰ رازک کاهش یافت (p<۰/۰۱). تعداد، حیات و تحرک اسپرم و غلظت تستوسترون در گروه ۱۰۰ و ۱۵۰ رازک نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری پیدا کرد (p<۰/۰۱). همچنین درصد باروری در گروه ۱۵۰ رازک (۷۶/۴±۲/۸۴) نسبت به گروه کنترل (۸۹/۴۳±۳/۳۱) کاهش یافت (p<۰/۰۱).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که مواجهه موشهای نر با رازک در مراحل اولیه زندگی موجب بلوغ دیررس و اثرات منفی بر عملکرد تولیدمثلی می گردد.

واژه های کلیدی: رازک، موش، بلوغ، باروری.

مقدمه

ترکیبات مداخله گر اندوکرینی (= Endocrine disrupting chemicals (EDCs)EDCs)، گروهی از ترکیبات طبیعی یا مصنوعی می باشند که از لحاظ ساختمان مولکولی شبیه برخی از هورمونهای درونزاد می باشند. این ترکیبات در صورت ورود به بدن قادر به انتقال در بافتهای بدن بوده و در سنتز، ترشح و عملکرد هورمونهای طبیعی دخالت می کنند (۲و۱). انسانها در طی زندگی خود در معرض مواجهه با هزاران EDCs از راه غذا، هوا و نوشیدنی ها می باشند. تاکنون بزرگترین نگرانی ها در ارتباط با اثرات EDCs بر بدن، متوجه دستگاه تولیدمثل و باروری در هر دو جنس نر و ماده شده است (۳-۱). در سالهای اخیر شواهد روز افزون حاکی از این بوده که مواجهه با EDCs موجب تغییر سن بلوغ، کاهش مداوم کمیت مایع سمین و افزایش اختلالات تولیدمثلی جنس نر می‌شود (۵و۴). شواهد نشان داده اند که مواجهه بیش از حد با استروژنها و EDCs شبه استروژنی در دوره های جنینی و نوزادی که دوره های بحرانی هورمونی هستند، ممکن است باعث ایجاد اختلال در دستگاه تولیدمثلی جنس نر و کاهش توانایی باروری گردند. همینطور مطالعات نشان داده اند که بیضه ها در دوره های جنینی و نوزادی نسبت به استروژنها و EDCs استروژنیک به شدت حساس و آسیب پذیر می باشند (۸-۶و۳). فیتواستروژنها ترکیبات گیاهی هستند که از لحاظ ساختاری به هورمون استرادیول شباهت داشته و توانایی واکنش با گیرنده های استروژنی را دارند(۹و۳). مطالعات آزمایشگاهی نشان داده اند که مواجهه با برخی فیتواستروژنها مثل جنیستین بویژه در طی دوره های جنینی و نوزادی باعث اختلال در تکوین و عملکرد دستگاه تولیدمثل نر می‌گردد (۱۲-۱۰). رازک (Humulus lupulus) گیاهی متعلق به خانواده Cannabaceae می‌باشد که به عنوان ماده خام در تولید ماء الشعیر کاربرد فراوانی دارد و دارای مصارف صنعتی و پزشکی می باشد (۱۵-۱۳). مطالعات نشان داده اند که رازک بعنوان یک فیتواستروژن حاوی ترکیبات شیمیایی مختلفی از جمله رزینها، بتامیرسن، همولون، تانن، اسید هموتانیک، مواد پکتینی، املاح پتاسیم و فلاونوئیدهای گوناگون از جمله ۸-پری نیلن آرینجنین و گزانتومول است (۱۵). از رازک، به دلیل داشتن ترکیبات مشابه با هورمونهای جنسی زنانه، در تنظیم عادت ماهیانه، درمان تورم و سختی رحم و اختلالات یائسگی استفاده می‌کنند (۱۶و۱۵). نتایج مطالعات نشان داده است که رازک در بزرگسالی، باعث افزایش معنی دار هورمونهای استروژن، پروژسترون و تستوسترون و افزایش تعداد سلولهای

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۷/۶۸۴۲۴/د دانشگاه پیام نور تهران می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر رحمت اله پرندین
آدرس: تهران، بلوار ارتش، خیابان نخل، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی. تلفن: ۸۴۲۳۴۱۰۲-۰۲۱
E mail: rahmatparandin@pnu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.49]

اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتید موش می شود (۱۷و۱۵). با این حال تاکنون مطالعه ای در ارتباط با تجویز رازک در دوره های جنینی و نوزادی و اثرات آن بر بلوغ جنسی و تولیدمثل گزارش نشده است.

با توجه به خواص شبه استروژنی رازک و آسیب پذیری بافتهای تولیدمثلی جنس نر در برابر ترکیبات استروژنی در دوره‌های حساس هورمونی، هدف از مطالعه حاضر تجویز عصاره الکلی گلهای رازک در دوره جنینی و نوزادی بر بلوغ و برخی شاخصهای اسپرم و درصد باروری در موشهای کوچک آزمایشگاهی نر می باشد.

مواد و روش‌ها

عصاره گیری: پس از پودر کردن گلهای خشک شده رازک، ۴۰ گرم از پودر حاصل پرکوله شده و سپس ۳۵۰ میلی لیتر الکل ۹۶٪ به آن اضافه شده و برای مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. سپس عصاره به صورت قطره قطره از یک قیف جداکننده عبور داده شد و در این حین حلال الکل به صورت قطره قطره و تا زمانی که محلول حاوی عصاره دیگر رنگی از گیاه نداشته باشد، اضافه گردید. عصاره حاصل در بن ماری با دمای ۵۰°C قرار گرفت تا الکل موجود بخار شده و بطور کامل تغلیظ گردد و سپس اجازه داده شد تا خشک شود (۱۵).

حیوانات، گروه بندی و تیمار: در این مطالعه تجربی پس از تصویب کمیته اخلاق دانشگاه پیام نور تهران با کد IR.PNU.REC.۱۳۹۶.۱، موشهای کوچک آزمایشگاهی نژاد *BALB/c* از مؤسسه رازی حصارک کرج تهیه شدند. موشهای نر و ماده جداگانه در قفسهای پلاستیکی استاندارد در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۱±۲۱ درجه سانتی گراد با دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. جهت انجام این مطالعه ۲۰ موش حامله مورد نیاز بود. به این منظور در ساعت ۷ بعدازظهر هر موش نر با دو موش ماده در یک قفس باهم آمیزش داده شدند.

حدود ۱۲ ساعت بعد از روش تشخیص پلاک واژینال جهت تعیین روز اول حاملگی استفاده شد و ۲۰ موش ماده که دارای پلاک واژینال بودند انتخاب شدند. موشهای حامله بطور تصادفی به ۵ گروه ۴ تایی شامل کنترل (فاقد تیمار)، شاهد (سالین) و سه گروه تجربی دریافت کننده عصاره الکلی گلهای رازک با دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ mg/kg تقسیم شدند.

تجویز ها بصورت روزانه از روز ۷ آبستنی تا ۷ روز پس از تولد نوزادان بوسیله گاواژ انجام شد. فرزندان در روز ۲۱ پس از تولد از شیر مادر محروم شدند. سپس از هر مادر ۲ یا ۳ فرزند نر بطور تصادفی انتخاب شده و در هر یک از زیرگروه های ۵ گانه تعداد ۱۰سر موش نر قرار گرفتند و جهت بررسی آغاز بلوغ و سایر شاخصهای تولیدمثلی مورد استفاده قرار گرفتند. لازم بذکر است با توجه به مراقبتهای لازم، در طی تحقیق هیچکدام از موشها از بین نرفتند.

بررسی آغاز بلوغ: جدایی پوست ختنه گاه(balano-preputial separation =BPS) بعنوان یک شاخص خارجی مناسب نشان دهنده فعال شدن محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد (HPG) و آغاز سن بلوغ جنسی در جوندگان جنس نر پیشنهاد شده است. در این روش پس از جداکردن موشهای نر از مادر از روز ۳۰ پس از تولد، برجستگی تناسلی موشهای نر روزانه بین ساعت ۸ تا ۱۱ صبح با استفاده از یک لوپ چشمی بررسی گردید. روز BPS با ایجاد انقباض و جمع شدگی در ناحیه ختنه گاه در نتیجه شاخی شدن سلولهای پوششی این ناحیه بدنبال افزایش تستوسترون در حدود روز ۴۰ پس از تولد اتفاق می افتد (۲۰–۱۸).

درصد باروری: در روز ۸۰ پس از تولد ۵ موش از هر گروه بطور تصادفی انتخاب شده و هر کدام با ۲ موش ماده سالم هم‌نژاد که توانایی باروری آن قبلا به اثبات رسیده بود برای مدت ۱۰ روز هم قفس شدند. پس از مشاهده وجود اسپرم در واژن موش و تعیین این روز به عنوان روز اول حاملگی، موشها در روز ۱۶ حاملگی با کلروفرم عمیقا بیهوش شده و پس از باز کردن شکم، تعداد جنینهای موجود در شاخهای رحم شمارش شدند. همینطور تخمدانها جدا شده و پس از شستشو در کلرید سدیم ۹٪، تعداد جسم زرد آنها با استفاده از لوپ شمارش گردید. شاخص باروری مطابق روش Oberlander و همکاران با تقسیم تعداد جنین بر تعداد جسم زرد تخمدان ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید (۲۱).

وزن اندام های جنسی: موشهای نر در روز ۹۰ پس از تولد با تزریق داخل صفاقی کتامین/زایلازین عمیقا بیهوش شده و پس از باز کردن شکم حیوانات، خون از قلب حیوان جهت سنجش هورمونی جمع آوری شده، سپس بیضه ها و اپیدیدیم را جدا کرده و پس از توزین جهت آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

شمارش اسپرم: با استفاده از همزن شیشه ای، ناحیه دم اپیدیدیم سمت چپ تا تشکیل یک مخلوط همگن کاملا خرد گردید. مقدار کمی از این سوسپانسیون به پیپت مخصوص شمارش گلبول سفید (تا علامت ۰/۵ پیپت) هدایت شد. سپس محلول ۵٪ بیکربنات سدیم به این سوسپانسیون تا رسیدن به علامت ۱۱ پیپت اضافه شد. سپس قطره ای از این محلول جدید به آرامی بر روی یک لام نئوبار قرار داده شد و با یک لامل تمیز روی آن پوشانده شد و با استفاده از یک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰، اسپرم های موجود در ۶۴ مربع کوچک مخصوص شمارش گلبول های سفید شمرده شده و تعداد کل اسپرمها بصورت میلیون/میلی لیتر با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۳و۲۲):

$$\text{تعداد اسپرم (میلیون/میلی لیتر)} = \frac{N \times ۲۰ \times ۱۰۰۰}{۰/۴}$$

N= تعداد اسپرم های شمارش شده

درصد تحرک و حیات اسپرم ها: مقداری از ناحیه دم اپیدیدیم سمت راست در ۰/۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی خرد و همگن شد. قطره ای از مخلوط فوق به لام نئوبار منتقل و درصد تحرک اسپرمها با شمارش تعداد اسپرمهای متحرک و بی تحرک در ۲۰ مربع مشخص شده و بصورت درصد بیان گردید. بمنظور ارزیابی میزان حیات اسپرمی، قطره ای از مخلوط فوق بر روی لام قرار گرفت و با قطره ای از رنگ ائوزین–نگروزین رنگ آمیزی شد و در زیر میکروسکوپ بررسی گردید. اسپرمهای زنده رنگ ائوزین– نگروزین را جذب نمی‌کنند ولی اسپرمهای مرده رنگ را جذب می‌کنند. پس از شمارش ۱۰۰ اسپرم به صورت تصادفی در زیر میدان دید میکروسکوپ که برای سه مرتبه تکرار شد، نسبت آنها بصورت درصد بیان شد (۲۲و۲۳).

سنجش هورمون تستوسترون: نمونه های خون جمع آوری شده با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آن جدا گردید و تا زمان سنجش هورمونی در فریزر ۲۰– نگهداری شدند. سطح سرمی هورمون تستوسترون با روش الایزا و توسط کیت تشخیص هورمونی (شرکت رادیم ایتالیا) بر اساس دفترچه راهنمای

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.49]

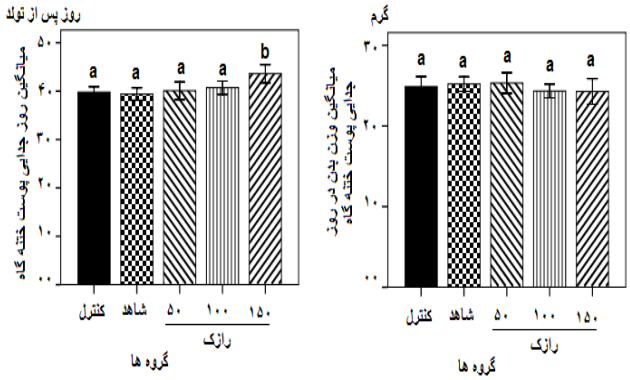
استفاده از کیت اندازه گیری شد. داده های بدست آمده، با کمک نرم افزار ۱۹ SPSS و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس آزمون تکمیلی توکی (Tukey post hoc) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و $p<۰/۰۵$ سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی آغاز بلوغ: میانگین روز BPS، ۳۹/۸±۰/۴۹ و ۳۹/۴±۰/۵۶، ۴۰/۱±۰/۸۱، ۴۰/۷±۰/۶۲ و ۴۳/۶ ±۰/۸۳ روز پس از تولد به ترتیب در گروه‌های کنترل، شاهد ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ رازک بود. روز BPS بطور معنی داری در گروه ۱۵۰ رازک ($p<۰/۰۵$) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (بلوغ دیررس). در مقایسه بین گروه های مختلف با گروه کنترل، میانگین وزن بدن در روز BPS تفاوت معنی داری مشاهده نگردید (نمودار۱).

نتایج بررسی وزن اندامهای جنسی: وزن بیضه و اپیدیدیم بطور معنی‌داری در گروه‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ رازک در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) (جدول۱).

نتایج بررسی شاخصهای اسپرم: تحرک، حیات و تعداد اسپرم در گروه های ۱۰۰ و ۱۵۰ رازک، کاهش معنی داری در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($p<۰/۰۵$) (جدول۲).



نمودار ۱. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. n=۱۰، (الف) بررسی روز آغاز بلوغ، (ب) وزن بدن در روز آغاز بلوغ

جدول۱. مقایسه تاثیر تیمارهای رازک بر وزن اندامهای جنسی در گروه های مورد مطالعه

گروه ها	وزن بیضه (mg)	وزن اپیدیدیم (mg)
کنترل	۱۸۶/۲±۲/۸۱^{a}	۴۵/۵±۰/۸۵^{a}
شاهد	۱۸۱/۸±۲/۵۳^{a}	۴۶±۰/۷۱^{a}
۵۰ رازک	۱۷۸/۹۰±۲/۳۸^{ac}	۴۴/۱±۰/۸۹^{a}
۱۰۰ رازک	۱۵۶±۴/۲۳^{b}	۳۴/۸±۱/۶۴^{b}
۱۵۰ رازک	۱۷۰/۷±۲/۷۹^{bc}	۳۵/۷±۱^{b}

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. n=۱۰

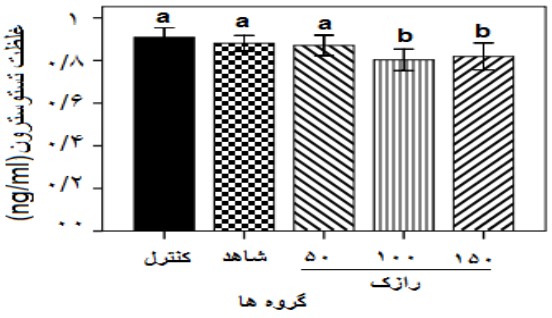
جدول۲. مقایسه تاثیر تیمارهای رازک بر تحرک، حیات و تعداد اسپرم در گروه های مورد مطالعه

گروه ها	تحرک اسپرم (٪)	حیات اسپرم (٪)	تعداد اسپرم (million/ml)
کنترل	۸۳/۴±۲/۱۴^{a}	۸۴/۲±۱/۷۹^{a}	۴۱/۸±۰/۷۱^{ab}
شاهد	۸۶/۵±۱/۲۸^{a}	۸۱/۹±۲/۰۴^{a}	۴۲/۷±۱^{a}
۵۰ رازک	۸۲/۴±۲/۵۱^{a}	۸۳/۴±۲/۳۹^{a}	۳۸/۳±۰/۸۲^{bc}
۱۰۰ رازک	۷۳/۵±۲/۶۴^{b}	۷۱/۶±۳/۶۵^{b}	۳۶/۱±۱/۰۳^{c}
۱۵۰ رازک	۶۶/۵±۱/۹۳^{b}	۷۰/۳±۲/۸۲^{b}	۳۵/۱±۱/۳۴^{c}

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. n=۱۰

نتایج بررسی غلظت تستوسترون: در گروه‌های ۱۰۰ و ۱۵۰رازک غلظت تستوسترون بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۲).

نتایج بررسی درصد باروری: ۹۰ درصد ماده ها در گروه کنترل و ۱۰۰ درصد آنها در گروه شاهد حامله بوده و این مقدار در گروه های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ رازک به ترتیب ۸۰، ۷۰ و ۷۰ درصد بود. همینطور درصد باروری در گروه ۱۵۰ رازک بطور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) (جدول۳).



نمودار ۲. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. n=۱۰

جدول ۳. مقایسه تاثیر تیمارهای رازک بر درصد باروری در گروه‌های مورد مطالعه

گروه ها	تعداد موش نر	موش ماده	ماده های حامله تعداد(درصد)	درصد باروری Mean±SD
کنترل	۵	۱۰	۹ (۹۰)	^{a}۸۹/۴۳±۳/۳۱
شاهد	۵	۱۰	۱۰ (۱۰۰)	^{a}۸۸/۳۰±۲/۰۳
۵۰ رازک	۵	۱۰	۸ (۸۰)	^{ab}۸۴/۵±۲/۱
۱۰۰ رازک	۵	۱۰	۷ (۷۰)	^{ab}۸۴±۲/۸۱
۱۵۰ رازک	۵	۱۰	۷ (۷۰)	^{b}۷۶/۴±۲/۸۴

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد می باشد

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از تاخیر در بلوغ جنسی و کاهش معنی دار تحرک، حیات و تعداد اسپرم، وزن بیضه و اپیدیدیم، غلظت تستوسترون و درصد

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.49]

باروری به دنبال تجویز جنینی و نوزادی عصاره الکلی رازک دارد. بلوغ جنسی در گروه ۱۵۰ رازک بطور معنی داری کمی دیرتر اتفاق افتاد. در این مطالعه کاهش در غلظت تستوسترون مشاهده گردید. برخی گزارشات قبلی نشان داده اند که BPS می تواند تحت تاثیر استروژنها و EDCs استروژنیک قرار گیرد. این مطالعات نشان داده اند که در مدلهای جوندگان نر، مواجهه با ترکیبات استروژنیک منجر به تاخیر در بلوغ جنسی می گردد (۲۴و۱۸). مواجهه موشها در دوره حاملگی و نوزادی با دی اتیل استیل بسترول (DES، یک ترکیب استروژنیک غیر استروئیدی) منجر به تاخیر در آغاز بلوغ جنسی و تاخیر در نزول بیضه شده که با مطالعه کنونی همخوانی دارد (۲۴و۱۸). اخیرا مطالعات نشان داده اند که مواجهه جوندگان در مراحل اولیه زندگی با استروئیدها و ترکیبات شبه استروژنی در تنظیم بیان مناسب ژن کیس پپتین در هیپوتالاموس که نقش مهمی در تنظیم آغاز بلوغ دارد حائز اهمیت فراوان می باشد. مواجهه نوزاد جوندگان با استروژن سنتتیک و ترکیبات شبه استروژنی منجر به کاهش بیان کیس پپتین در بلوغ شده است (۲۶و۲۵و۱۸). با توجه به خاصیت استروژنیک رازک ممکن است از این طریق منجر به تاخیر در بلوغ جنسی شده باشد. در برخی مطالعات پیشنهاد شده که بلوغ جنسی می تواند ناشی از تغییرات وزن بدن باشد. لاغری و کاهش وزن، بلوغ جنسی را به تاخیر می اندازد (۲۹-۲۷). با توجه به نتایج این مطالعه، اختلاف معنی داری بین وزن بدن در روز آغاز بلوغ جنسی مشاهده نشد. در همین زمینه برخی مطالعات دیگر نشان داده اند که وزن بدن برای تنظیم زمان آغاز بلوغ در انسان یا حیوانات آزمایشگاهی ضروری نمی باشد (۳۰).

وزن بیضه و اپیدیدیم، تحرک، حیات و تعداد اسپرم عمدتا در گروه های ۱۰۰ و ۱۵۰ رازک بطور معنی داری کاهش یافت. مطالعات نشان داده اند که وزن اندامهای جنسی بیضه و اپیدیدیم و همینطور عملکرد اسپرم عمدتا توسط هورمون تستوسترون تنظیم می شود (۳۲و۳۱). بنابراین تجویز رازک در دوره های اولیه تکوین ممکن است بدلیل داشتن ترکیبات استروژنیک، مستقیما بر بیضه یا غیرمستقیم بر سطوح بالاتر کنترل کننده عملکرد بیضه یعنی هیپوتالاموس و هیپوفیز اثرات سوئی را اعمال کرده باشد. مطالعات در دوره های جنینی و نوزادی، توزیع گیرنده های استروژنی در سلولهای زاینده، لایدیگ و سرتولی موجود در بیضه پستانداران را نشان داده اند. این مطالعات نشان داده اند که وجود حداقل مقدار استروژن برای تکوین و عملکرد بیضه ها ضروری می باشد ولی افزایش استروژن (یا ترکیبات شبه استروژنی) در دوره های بحرانی ممکن است از طریق مکانیسمهای مختلفی از جمله فعال کردن مسیرهای آپوپتوز اثرات سوئی را بر بافتهای تولیدمثلی اعمال کند (۸-۶). در مطالعه ای نشان دادند که تجویز جنیستین احتمالا با دخالت در بیان ژنهای تنظیم کننده استروئیدوژنز از جمله سیتوکروم P450 منجر به کاهش تعداد سلولهای لایدیگ و کاهش غلظت تستوسترون می گردد (۳۳). یافته ها نشان داده اند که جنیستین بدلیل شباهت ساختاری با استروژنها از طریق گیرنده های استروژن قادر به پیام رسانی می باشد (۳۴). مطالعات دیگری نشان داده اند که resveratrol یک ترکیب شبه استروژنی یافته شده در انگور و شراب دارای اثرات سوء بر استروئیدوژنز سلول های لایدیگ و تولید تستوسترون از طریق مهار بیان ژن های StAR و سیتوکروم P450 می باشد (۳۵). در مطالعه دیگری نشان داده اند که مواجهه موشهای نر با DES در طی دوره جنینی منجر به کریپتوکیدیسم و هیپوسپادیاس و عدم تکوین مناسب اندامهای جنسی شده است (۳۶). بطور مشابهی تیمار نوزادی رتهای نر با DES منجر به دامنه وسیعی از اختلالات تولیدمثلی از جمله تاخیر در نزول بیضه، تاخیر در آغاز اسپرماتوژنز در بلوغ، کاهش وزن بیضه، تغییرات مرفولوژیکی در بیضه و غدد ضمیمه، کاهش تعداد سلولهای لایدیگ، سرتولی و سلولهای جنسی، کاهش غلظت تستوسترون و FSH شده است (۳۷و۵). مشاهده کاهش در درصد باروری موشهای ماده نیز می تواند به کاهش در تحرک، حیات و تعداد اسپرم موشهای نر قابل توجیه باشد. مطالعات نشان داده اند که ۸-پری نیلن آرینجنین موجود در رازک بعنوان یکی از قویترین ترکیبات فیتواستروژنی شناخته شده می باشد. برخی گزارشات نیز بیان کرده اند که ۸-پری نیلن آرینجنین در بین همه فیتواستروژنها دارای بیشترین تمایل با گیرنده های استروژن می باشد (۳۹و۳۸). علاوه بر ۸-پری نیلن آرینجنین، ترکیبات دیگری با داشتن خاصیت استروژنیک از جمله β-acids، β-sitosterol، o-hydroxy dibenzoyl methane، xanthohumol و desmethyl xanthohumol در رازک شناسایی شده اند (۴۰-۳۸و۱۶). مطالعات آینده در ارتباط با بررسی اثرات ترکیبات استروژنیک موجود در رازک می تواند مفید باشد. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که تیمار جنینی نوزادی عصاره الکلی رازک موجب بلوغ دیررس و اثرات سوء بر توانایی تولیدمثلی موشهای بالغ می‌گردد که این اعمال می تواند ناشی از اثرات استروژنیک و دائمی این گیاه در طی دوران تکوین جنینی نوزادی بر اجزای مختلف محور HPG باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری پرسنل گروه زیست شناسی دانشگاه رازی بویژه آقای دکتر نامدار یوسفوند، تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.49]

The Effect of Alcoholic Extract of Humulus Lupulus During Pregnancy and Lactation on Sexual Maturation and Some Reproductive Indices in Male Rats

R. Parandin (PhD)[1•], Sh. Daroogari (MSc)[1]

1.Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University of Tehran, Tehran, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 20(1); Jan 2018; PP: 43-9

Received: Jul 8th 2017, Revised: Sep 24th 2017, Accepted: Dec 16th 2017

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: *Humulus lupulus* is known for its estrogenic properties as a raw material in the beverage industry. Exposure to exogenous estrogenic compounds during embryonic and neonatal periods are now of public health concern, since it may cause reproductive impairment. Therefore, this study was conducted to evaluate treatment with *humulus lupulus* during early stages of life on the onset of puberty and some reproductive indices in male rats.

METHODS: In this experimental study, 20 pregnant mice were divided into five groups of four, including control (without treatment), control (saline) and three groups treated with alcoholic extract of *humulus lupulus* at 50, 100, 150 mg/kg/bw concentrations. They were treated daily from the seventh day of pregnancy to seven days after birth by gavage. Then, the effect of alcoholic extract of *humulus lupulus* on the onset of puberty, testicular weight and epididymis, sperm count, viability, and motility, testosterone concentration and the fertility of male children were evaluated.

FINDINGS: The onset of puberty in the 150 mg/kg *humulus lupulus* group (43.6±0.83) occurred later than the control (39.8±0.49) ($p<0.01$). Testicular and epididymis weight decreased in 100 and 150 *humulus lupulus* groups ($p<0.01$). The sperm count, viability, and motility and testosterone concentrations in the 100 and 150 mg/kg *humulus lupulus* group were significantly lower than the control group ($p<0.01$). In addition, the percentage of fertility in the 150 mg / kg *humulus lupulus* group (76.4±2.84) was lower than the control group (89.43±3.31) ($p<0.01$).

CONCLUSION: The results of this study showed that exposure of male rats to *humulus lupulus* in early stages of life causes late puberty and has negative effects on reproductive performance.

KEY WORDS: *Humulus lupulus, Rat, Puberty, Fertility*.

Please cite this article as follows:

Parandin R, Daroogari Sh. The Effect of Alcoholic Extract of Humulus Lupulus During Pregnancy and Lactation on Sexual Maturation and Some Reproductive Indices in Male Rats. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(1):43-9.

•Corresponding author: R. Parandin(PhD)
Address: Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Nakhl St, Artesh Highway, Tehran, I.R.Iran.
Tel: +98 21 2332 0000
E-mail: rahmatparandin@pnu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.49]

References

1.Sifakis S, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM, Spandidos DA. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. Environ Toxicol Pharmacol. 2017;51:56-70.

2.Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. Endocr Rev. 2009;30(4):293-342.

3.Jefferson WN, Patisaul HB, Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. Reproduct. 2012;143(3):247-60.

4.Knez J. Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. Rep Biomed Online. 2013;26(5):440-8.

5.Jeng HA. Exposure to endocrine disrupting chemicals and male reproductive health. Front Pub Health. 2014;2(1-12):55.

6.Delbes G, Levacher C, Habert R. Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development. Reproduction. 2006;132(4):527-38.

7.Delbes G, Levacher C, Pairault C, Racine C, Duquenne C, Krust A, et all. Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by endogenous estrogens during perinatal life. Endocrinology. 2004;145(7):3395-403.

8.Delbes G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P, Habert R. Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. Endocrinology. 2005;146(5):2454-61.

9.Heather B, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. Front Neuroendocrinol. 2010;31(4):400-19.

10.Zhang LD, Deng Q, Wang ZM, Gao M, Wang L, Chong T, Li HC. Disruption of reproductive development in male rat offspring following gestational and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and genistein. Biol Res. 2013;46(2):139-46.

11.Lehraiki A, Chamaillard C, Krust A, Habert R, Levacher C. Genistein impairs early testosterone production in fetal mouse testis via estrogen receptor alpha. Toxicol In Vitro. 2011;25(8):1542-47.

12.Wisniewski AB, Cernetich A, Gearhart JP, Klein SL. Perinatal exposure to genistein alters reproductive development and aggressive behavior in male mice. Physiol Behav. 2005;84(2):327-34.

13.Zanoli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of Humulus lupulus L. J Ethnopharmacol. 2008;116(3):383-96.

14.Cleemput MV, Cattor K, Bosscher KD, Haegement G. Hop (humulus lupulus)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. J Nat Prod. 2009;72(6):1220-30.

15.Hosseini SE. Effect of alcoholic extract of hops flowers (humulus lupulus l.) on the sex ratio in offspring of syrian mice. Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv. 2017;38(6):12-7.[In Persian].

16.Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR. The pharmacognosy of humulus lupulus (hops) with an emphasis on estrogenic properties. Hytomedicine. 2006;13(1-2):119-31.

17.Tavakkoli Kazeroni H, Hosseini S, Shariati M. The effect of hops (Humulus lupulus L.) ethanol extracts on the sexual hormones levels and sexual dynastic cells of Syrian adult male mice. J Sabzevar Univ Med Sci. 2014;21(3):514-21. [In Persian].

18.Yoshimura S, Yamaguchi H, Konno K, Ohsawa N, Noguchi S, Chisaka A. Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. J Toxicol Pathol. 2005;18(3):141-57.

19.Deboer MD, Li Y. Puberty is delayed in male mice with dextran sodium sulfate colitis out of proportion to changes in food intake, body weight, and serum levels of leptin. Pediatr Res. 2011;69(1):34-9.

20.Stoker TE, Laws SC, Guidici DL, Cooper RL. The effect of atrazine on puberty in male wistar rats: an evaluation in the protocol for the assessment of pubertal development and thyroid function. Toxicol Sci. 2000;58(1):50-9.

21.Oberlander G, Yeung CH, Cooper TG. Induction of reversible infertility in male rats by oral ornidazole and its effects on sperm motility and epididymal secretions. J Reprod Fertil. 1994;100(2):551-9.

22.Khouri NA, Nawasreh M, Al-Hussain SM, Alkofahi AS. Effects of orchids (Orchis anatolica) on reproductive function and fertility in adult male mice. Reproduct Med Biol. 2006;5(4):269-76.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.49]

23.Parandin R, Yousofvand N, Ghorbani R. The enhancing effects of alcoholic extract of Nigella sativa seed on fertility potential, plasma gonadotropins and testosterone in male rats. Iran J Reprod Med. 2012;10(4):355-62.
24.Zawatski W, Lee MM. Male pubertal development: are endocrine-disrupting compounds shifting the norms. J Endocrinol. 2013;218(2):1-12.
25.Ebling FJ. The neuroendocrine timing of puberty. Reproduction. 2005;129(6):675-83.
26.Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Gerard A, Bourguignon JP. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. Front Neuroendocrinol. 2015;38:12-36.
27.Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenbergh JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol a advances puberty. Nature. 1999;401(6755):763-64.
28.Foster PM, McIntyre BS. End ocrine active agents: implications of adverse and non-adverse changes. Toxicol Pathol. 2002;33(3):59-65.
29.Zhu HJ, Pan H, Zhang DX, Wu QY, Zhang K, Li M, et al. Effect of bodyweight on the onset of puberty of female children and adolescents. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 2010;32(1):25-8.
30.da Silva Faria T, da Fonte Ramos C, Sampaio FJ. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. J Nutr Biochem. 2004;15(2):123-7.
31.Choudhary A, Steinberger E. Effect of 5a-reduced androgen on sex accessory organs, initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. Biol Reprod. 1975;12:609-17.
32.Serge Carreau1, Rex A. Oestrogens and spermatogenesis. Phil Trans R Soc B. 2010;365(1546):1517-35.
33.Svechnikov K, Supornsilchai V, Strand ML, Wahlgren A, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Soder O. Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary-gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. J Endocrinol. 2005;187(1):117-24.
34.Mueller SO. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. Anal Bioanal Chem. 2004;378(3): 582-7.
35.Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, Tringali C, Söder O. Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro. J Appl Toxicol. 2009; 29(8):673-80.
36.McLachlan JA, Newbold RR, Burow ME, Li SF. From malformations to molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters. APMIS. 2001;109(4):263-72.
37.Hejmej A, Kotula-Balak M, Bilinska B. Antiandrogenic and estrogenic compounds: Effect on development and function of male reproductive system. 2011;53-81. Availble From: https://www.researchgate.net/publication/221918386_Antiandrogenic_and_Estrogenic_Compounds_Effect_on_Development_and_Function_of_Male_Reproductive_System.
38.Olsa B, Kolodziejczyk J, Wachowicz B, Jedrejek D, Stochmal A, Oleszek W. The extract from hop cones (Humulus lupulus) as a modulator of oxidative stress in blood platelets. Platelets. 2011; 22(5): 345–52.
39.Van Hunsel F, Van de Koppel S, `Van Puijenbroek E. Post-Menopausal Vaginal Hemorrhage Related to the Use of a Hop-Containing Phytotherapeutic Product. Drug Saf - Case Rep. 2015); 2: 14.
40.Biendl M. Estrogenic activity of hop components. Brauwelt International. 2004; 22 (1): 24-8.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1396.20.1.6.0]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.20.1.49]