بررسی تاثیر عصاره‌های فلاونوییدی میوه و برگ گیاه پنج انگشت (*Vitex agnus – castus* L.) بر تغییرات میزان سرمی هورمون پرولاکتین در موش‌های صحرایی ماده

محمد آزادبخت[1]*، امین‌ا... بهاءالدینی[2]، سیده مریم شوریده ضیابری[3]، علی ناصرزاده[3]

۱- دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز

۳- کارشناس ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز

*آدرس مکاتبه: ساری، کیلومتر ۱۷ جاده دریا، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی

صندوق‌پستی: ۸۶۱- ۴۸۱۷۵، تلفن: ۳۳۴۳۰۸۳ (۰۱۵۲)، نمابر: ۳۳۴۳۰۸۲ (۰۱۵۲)

پست الکترونیک: Azadbakhtm@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۳/۳/۵ **تاریخ تصویب:** ۸۴/۵/۳۰

چکیده

مقدمه: گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus – castus* L.) از خانواده شاه‌پسند (Verbenaceae) از گیاهان دارویی در طب سنتی ایران بوده که از آن در مواردی مثل کاهش میل جنسی و افزایش دادن میزان شیر استفاده می‌کرده‌اند. در این تحقیق اثر عصاره میوه و برگ این گیاه بر میزان سرمی هورمون پرولاکتین بررسی شده است.

روش بررسی: عصاره به روش خوراندن، در دوران پرواستروس و شیردهی به موش‌های صحرایی ماده تجویز شده است. گروه‌های شاهد مربوط به هر دوران، به جای عصاره آب مقطر دریافت کرده‌اند. برای تهیهٔ نمونهٔ خونی از هر موش در مراحل تعیین شده (پرواستروس و روز سوم شیردهی) حیوان با استنشاق اتر بیهوش شده و پس از برداشت مقدار لازم خون از قلب آن کشته می‌شد. سرم خون نمونه‌های بالا به وسیله سانتریفوژ جدا شده و برای اندازه‌گیری میزان هورمون پرولاکتین سرم به روش رادیوایمنواسی (RIA) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آماری به دست آمده به وسیله آنالیز واریانس یگانه و چندگانه و آزمون آماری LSD با در نظر گرفتن $p < ۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که دوزهای mg/kg/day ۷۰ و ۱۰ عصاره میوه و دوز mg/day ۱۰ عصاره برگ باعث کاهش میزان پرولاکتین در دوره پرواستروس شده ولی دوز mg/kg/day ۷۰ عصاره برگ باعث افزایش پرولاکتین در دوره پرواستروس شده است. از طرفی هر دو دوز و هر دو عصاره باعث افزایش معنی‌دار میزان پرولاکتین در دوره شیردهی نسبت به گروه شاهد شده‌اند. افزایش میزان پرولاکتین توسط عصاره میوه در دوران شیردهی با دوز mg/kg/day ۷۰ بیشتر از دوز mg/kg/day ۱۰ بوده است. از طرفی در مقایسه عصاره‌های برگ و میوه و همچنین مقایسه دوزهای mg/kg/day ۷۰ و ۱۰ عصاره میوه با دوز mg/kg/day ۷۰ در دوره شیردهی باعث بیشترین افزایش در میزان سرمی پرولاکتین شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق با مطالب موجود در طب سنتی در مورد گیاه پنج‌انگشت مبنی بر اینکه این گیاه باعث افزایش شیر می‌شود ممکن است همخوانی داشته باشد.

گل‌واژگان: پنج‌انگشت، پرولاکتین، شیردهی، پرواستروس

مقدمه

از چوب، برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت از زمان‌های قدیم در طب سنتی ایران برای کاهش میل جنسی و افزایش شیر استفاده شده است [۱]. این گیاه در یونان و روم به دلیل کاهش دادن میل جنسی به درخت پاکدامنی[1] یا فلفل راهب[2] شهرت یافته است [۲].

گیاه پنج‌انگشت[3] به خانواده شاه‌پسند[4] تعلق دارد. این گیاه به صورت درختچه‌ای پایا با شاخه‌های دو ردیفی قهوه‌ای و پوست آن به صورت ورقه ورقه یا تکه‌تکه است. ارتفاع آن نیم تا سه متر و گاهی به پنج متر می‌رسد. برگ‌های آن دارای پنج تا هفت برگچه است. درشتی گلبرگ‌ها سه برابر کاسبرگ‌ها، کاسه گل پیوسته، جام گل آبی تا بنفش، دارای چهار پرچم (دو تا بلندتر از دیگری) می‌باشد [۳،٤].

مهمترین ترکیبات شیمیایی چوب، برگ و میوه این گیاه، در جدول شماره ۱ ارایه شده است.

همانطوری‌که در این جدول ملاحظه می‌شود فلاونوییدها، ترکیبات اصلی قسمت‌های مختلف گیاه را تشکیل می‌دهند [٤].

اثرات ضد التهابی و التیام‌دهندگی زخم‌ها با عصاره گونه *Vitex leucoxylon* گزارش شده است [۵]. فلاونوییدهای استخراج شده از دانهٔ گونه *V. negundo* دارای اثرات ضدبارداری[5] و ضدآندروژنی[6] روی سیستم تولید مثلی سگ‌های نر است [٦،۷].

اسانس برگ‌های گیاه *Vitex agnus – castus* دارای فعالیت ضدمیکروبی روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی بوده است [٤]. عصاره این گیاه عدم تعادل هورمونی وابسته به استروژن بالا[7] یا سندرم پیش قاعدگی را تصحیح کرده و علایم مربوط را کاهش می‌دهد [۸].

پس از فرا رسیدن بلوغ جنسی و قبل از حاملگی، ظهور فعالیت جنسی در موش‌های صحرایی ماده (استروس) به صورت دوره‌ای اتفاق می‌افتد. در موش صحرایی[8] طول دوره استروس ٤ یا ۵ روز بوده و دارای چهار مرحله زیر است: پرواستروس (این مرحله فاز ساخت یا Biulding up است که طی آن هورمون‌های LH و FSH تخمدان را تحریک نموده تا مقدار زیادی استروژن و احتمالاً پروژسترون تولید کند. سپس این دو هورمون سبب آمادگی بیشتر اویدوکت‌ها، رحم و واژن می‌شوند)، استروس (مرحله تخمک‌گذاری)، متاستروس (حدود ۲۰ ساعت) و دی استروس (طولانی‌ترین مرحله سیکل است و ٦۰ تا ۷۰ ساعت طول می‌کشد) [۹].

میزان غلظت پرولاکتین در دوران بارداری ۱۰ تا ۲۰ بار بالاتر از حالت معمولی است. پرولاکتین سیکل استروس را به عقب می‌اندازد و باعث القای شیردهی می‌شود [۱۰].

در این تحقیق به منظور بررسی اثر عصاره فلاونوییدی میوه و برگ گیاه پنج‌انگشت بر میزان پرولاکتین، میزان سرمی پرولاکتین در دوران پرواستروس و روز سوم شیردهی در موش‌های صحرایی ماده مورد اندازه‌گیری قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد و دستگاه‌ها: شامل کیت پرولاکتین (ساخت شرکت کاو شیار تهران) اتانول، متانول، پترولئوم اتر، اتر، هگزامتیلن ترامین، منیزیم و کلریدآلومینیوم شرکت مرک آلمان، اسید کلریدریک شرکت فلوکای آلمان و دستگاه شمارشگر گاما، (Gamatic – 1 آمریکا) روتاری (Heidolph)، سانتریفوژ (شرکت Ecco Berlin)، حمام آب گرم (مدل Sueria QRD ساخت آلمان)، میکروسکوپ (مدل Zeiss آلمان)، اسپکتروفتومتر (مدل Uv – 120 – 20 ساخت شرکت شیمادزو، ژاپن)، مواد و وسایل معمولی آزمایشگاه

تهیه و شناسایی گیاه: گیاه *Vitex agnus – castus* از منطقه بین روستای بوستان و روستای چم بلبل واقع در ۱۳۰ کیلومتری جاده یاسوج – گچساران (ارتفاع از سطح دریا ۵۷۰ متر) جمع‌آوری گردید و توسط گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم شیراز شناسایی شد.

---

[1] Chaste tree
[2] Monks pepper
[3] *Vitex agnus – castus* L.
[4] Verbenaceae
[5] Antifertility
[6] Antiandrogenic
[7] Hyperproestrogenism
[8] Rat

جدول شماره ۱- ترکیبات شیمیایی گیاه پنج‌انگشت (*Vitex agnus – castus* L.)

	ایریدویید	فلاونویید	آلکالویید	گلیکوزید	استرویید
اندام چوبی	Aucubin Agnuside	Flavon – c–glycoside (type orentin)	-	-	-
برگ	Aucubin Agnuside Eterostoside	Casticin, Omoorientin, Orientin Isoorientin, Isovitexin Isovitexin-glucoside Isovitexin-xyloside Luteolin-7-glycoside	Viticin	Vitexin, Vitexinin	A4-3-ketoester
میوه	Aucubin Agnuside	Casticin 6-idrossikamferol-3,6,7,4 tetramethyl= ether Pendulein, Chysosplenol D	-	Castin	-

تهیه عصاره فلاونوییدی از برگ و میوه: مقدار ۵۰ گرم از پودر برگ و میوه به طور جداگانه در داخل دستگاه سوکسله ریخته شد و با ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درجه سانتی‌گراد عصاره‌گیری به مدت ٦ – ٤ ساعت انجام گردید. پایان زمان استخراج با انجام تست سیانیدین جهت استخراج کامل فلاونوییدها تعیین شده است. حاصل استخراج توسط اسیدکلریدریک اسیدی شده و توسط اتیل استات سه بار و هر بار با ۱۰۰ میلی‌لیتر دکانته شد. حاصل استخراج اتیل استاتی توسط دستگاه دوار تقطیر در خلا تغلیظ شده و پس از تعیین درصد، ماده خشک موجود در عصاره‌ها و همچنین اندازه‌گیری میزان فلاونوییدها، در هر کدام با استفاده از هگزامتیلن تترامین (با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٢٢ نانومتر)، عصاره‌ها در یخچال نگهداری می‌گردید [۱۱].

تغذیه و نگهداری موش صحرایی: برای انجام این تحقیق از موش‌های صحرایی آزمایشگاهی ماده بالغ و سالم از نژاد Charles River با وزن حدود ۲۲۰ – ۱۸۰ گرم و سن چهار تا پنج ماهگی استفاده شد. در مدت مطالعه موش‌ها در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و درجه حرارت ۲۵ – ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شدند. موش‌های مورد مطالعه قبل از تجویز عصاره به مدت حداقل چهار روز در شرایط فوق نگهداری شدند تا به شرایط محیط کاملاً عادت نمایند و طی مدت فوق حیوانات از غذای معمولی و آب کافی بهره‌مند بودند. در این مدت حیوانات از نظر نظم مراحل دوران استرس مطالعه می‌شدند و پس از اطمینان از وجود نظم مزبور، از طریق نمونه‌گیری از ترشحات واژن و مشاهده سلول‌های موجود در اسمیر در زیر میکروسکوپ و تعیین وضعیت سیکل، عصاره‌ها داده می‌شدند. حیوانات دوران شیردهی حداقل چند روز پیش از زایمان به محل نگهداری منتقل شده و عصاره‌دهی می‌شدند و پس از زایمان فرزندان حیوان به همراه مادر در قفسه جداگانه نگهداری می‌شدند.

گروه‌های حیوانی مورد مطالعه: موش‌های صحرایی به دو گروه شاهد و آزمایشی تقسیم شدند. گروه آزمایشی خود به دو گروه دریافت‌کننده دوزهای ۱۰ و ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز تقسیم گردیدند. در گروه شاهد از مایع هم حجم آب مقطر معادل دوز تعیین شده، استفاده می‌شد. در هر یک از مراحل پرواستروس، دوران شیردهی و گروه شاهد، پنج موش به طور جداگانه مورد آزمایش قرار گرفتند.

روش تجویز عصاره: پیش از تجویز عصاره موش‌ها وزن می‌شدند و براساس وزن موش عصاره داده می‌شد. برای تجویز عصاره از سرنگ‌های معمولی مجهز به Feeder – needle دهانی – حلقی (Oropharyngeal tube) استفاده شد.

خون‌گیری و تهیه سرم از موش صحرایی: عمل خونگیری طی مرحله پرواستروس سیکل جنسی پس از عصاره‌دهی، برای هر یک از موش‌ها انجام گردید. بدین‌ترتیب که با پیش‌بینی زمان پیدایش مرحله پرواستروس عمل نمونه‌گیری از واژن انجام گرفته و پس از اطمینان یافتن از پیدایش مرحله جنسی بالا، حیوان توسط استنشاق اتر بیهوش می‌گردید. عمل خون‌گیری در دوران شیردهی در روز سوم انجام شده است. در این مرحله پس از شکافتن سینه حیوان، به میزان لازم، از قلب خون‌گیری به عمل می‌آمد. خون تهیه شده در لوله آزمایش مخصوص به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌شد و سرم‌های تهیه شده در دمای (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری و در زمان معین برای اندازه‌گیری غلظت هورمون پرولاکتین مورد استفاده قرار می‌گرفتند.

اندازه‌گیری غلظت هورمون:

میزان ۲۵ میکرولیتر نمونه هر سرم به همراه ۳۰۰ میکرولیتر از Sample tracer در لوله کیت مخصوص اندازه‌گیری پرولاکتین (Coated با آنتی‌بادی علیه پرولاکتین و نشان‌دار شده با ید ۱۲۵) ریخته شده و پس از مخلوط شدن به مدت یک ساعت همراه با تکان دادن در دمای اتاق انکوبه می‌شد. سپس محلول روی نمونه‌ها خالی و با آب مقطر شستشو می‌شدند. سپس لوله‌ها خالی و کاملاً خشک شده و آن‌گاه به مدت معین (به ازای ۱۰۰۰۰ شمارش در هر لوله یا شمارش به مدت حداقل یک دقیقه) توسط دستگاه شمارشگر گاما، میزان پرولاکتین اندازه‌گیری می‌شد.

روش‌های تجزیه و تحلیل آماری:

از مقادیر به دست آمده در آزمایش‌ها میانگین‌گیری شد و سپس با روش واریانس (Multiple comparison ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. ضمناً برای تعیین گروه‌های متفاوت از تست آماری LSD با در نظر گرفتن $p < ۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج

از ۵۰ گرم پودر برگ و میوه به ترتیب ٦/٨ و ٣/٠٠٦ گرم عصاره خشک به دست آمد بعبارتی عصاره خشک شده برگ و میوه حاصل از الکل °۵۰ به ترتیب ١٤ و ٦/٠١٢ درصد می‌باشد.

میزان فلاونویید موجود در عصاره‌های برگ و میوه گیاه، که از نمودار بیرلامبرت تهیه شده از ویتکسین استاندارد به دست آمده، محاسبه شد و مقادیر آن به ترتیب ٩/٢٧٥ و ٨/٣٢٤ درصد بوده است.

میزان تاثیر دوزهای مختلف عصاره برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت بر میزان پرولاکتین سرم در مرحله پرواستروس سیکل جنسی و همچنین در زمان شیردهی در موش‌های صحرایی در جدول شماره ۲ ارایه شده است.

جدول شماره ۲- میزان تاثیر عصاره فلاونوییدی برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت بر میزان پرولاکتین سرم در مراحل پرواستروس سیکل جنسی و شیردهی در موش‌های صحرایی

مرحله	غلظت سرمی پرولاکتین (miu/ml) در مرحله پرواستروس		غلظت سرمی پرولاکتین (miu/ml) در مرحله شیردهی	
گروه	**با عصاره برگ**	**با عصاره میوه**	**با عصاره برگ**	**با عصاره میوه**
دوز ۱۰ mg/kg/day	٣٨/٢ ± ٤/٥	٣٢/٦ ± ٣/٩	٣٢/٤ ± ٥/٢	٣١/٠ ± ٤/٨
دوز ۷۰ mg/kg/day	٥٠/٥ ± ٧/٤	٣٠/٥ ± ٢/٦	٣٠/٤ ± ١/٦	٣٩/٧ ± ١٠/٣
شاهد	٤٥/١ ± ١/٦	٣٧/٢ ± ٤/٢	٢٦/٨ ± ١/٨	٢٩/٩ ± ١/٨

همچنین در این تحقیق اثر عصاره برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت بر میزان وزن حیوانات گروه آزمایشی در مرحله پرواستروس و شیردهی مورد آزمایش قرار گرفته و میزان تفاوت وزن پایانی نسبت به شروع آزمایش در پاسخ به تجویز دوزهای مختلف اندازه‌گیری شده است. میانگین تغییرات وزن در هیچ یک از گروه‌های آزمایشی نسبت به قبل از تجویز عصاره تفاوت معنی‌داری ندارد.

بحث

ترشح هورمون پرولاکتین به وسیله هیپوتالاموس و با ترشح دو فاکتور، یکی مهارکننده (PIF) و دیگری به نام PRH که ترشح آن را تحریک کند، کنترل می‌شود. میزان ترشح پرولاکتین به طور فیزیولوژیکی در مدت بارداری و پس از زایمان در دوران شیردهی افزایش می‌یابد به طوری‌که در دوران بارداری غلظت پرولاکتین ۱۰ تا ۲۰ برابر بیشتر از حالت معمول است [۱۰]. نقش‌های بی‌شمار و گوناگون پرولاکتین همچون پایداری فعالیت ترشحی غدد پستانی، همراهی عمل آن با آندروژن‌ها و اثر آن در متابولیسم آندروژن‌ها، شباهت آن با فاکتور رشد سلولی، تاثیر آن در حیوانات بر عمل تخمدان‌ها و مهار سیکل استروس، اثر بر رشد جسم زرد (اثر لوتئوتروپیک) از جمله نقش‌های پرولاکتین می‌باشد. پرولاکتین همچنین قادر به تنظیم گنادوتروپین‌ها است به طوری‌که بالا رفتن میزان پرولاکتین، ترشح LH را مهار می‌کند. ترشح پرولاکتین و گنادوتروپین‌ها LH و FSH و وقوع تخمک‌گذاری تحت اثر استروژن بوده و افزایش غلظت استروژن همراه با رشد فولیکول، محرکی فیزیولوژیک برای رشد گناد و تروپین‌ها و پرولاکتین می‌باشد [۹،۱۲].

با توجه به نتایج به دست آمده، در این تحقیق، دوزهای ۷۰ mg/kg/day و ۱۰ عصاره میوه و دوز ۱۰ mg/kg/day عصاره برگ باعث کاهش میزان پرولاکتین در دوره پرواستروس شده ولی دوز ۷۰ mg/kg/day عصاره برگ باعث افزایش پرولاکتین در دوره پرواستروس شده است. از طرفی هر دو دوز و هر دو عصاره باعث افزایش معنی‌دار میزان پرولاکتین در دوره شیردهی نسبت به گروه شاهد شده‌اند. افزایش میزان پرولاکتین توسط عصاره میوه در دوران شیردهی با دوز ۷۰ mg/kg/day بیشتر از دوز ۱۰ mg/kg/day بوده است. از طرفی در مقایسه عصاره‌های برگ و میوه و همچنین مقایسه دوزهای ۱۰ و ۷۰ mg/kg/day، عصاره میوه با دوز ۷۰ mg/kg/day در دوره شیردهی باعث بیشترین افزایش در میزان سرمی پرولاکتین شده است.

نتایج این تحقیق با مطالب موجود در طب سنتی در مورد گیاه پنج‌انگشت مبنی براینکه این گیاه باعث افزایش شیر می‌شود ممکن است همخوانی داشته باشد [۱] به دلیل اینکه در زمان شیردهی و بارداری میزان پرولاکتین افزایش می‌یابد و از طرفی عصاره برگ و میوه گیاه پنج‌انگشت نیز به طور کلی باعث افزایش ترشح پرولاکتین به ویژه در دوران شیردهی شده است هر چند که پاسخ میزان ترشح با دوزهای مختلف عصاره برگ و میوه متفاوت می‌باشد.

از طرفی در طب سنتی ادعا شده است که این گیاه باعث کاهش میل جنسی می‌شود [۱]. ممکن است این اثر با واسطه استروژن انجام گیرد و از طرفی در این تحقیق مشخص شده است که عصاره برگ و میوه این گیاه باعث افزایش کلی پرولاکتین می‌گردند. بنابراین ممکن است مکانیسم افزایش ترشح پرولاکتین در ارتباط با استروژن و گناد و تروپین‌ها باشد [۱۳].

منابع

۱. ابن‌سینا، *قانون در طب*. ترجمه شرفکندی، انتشارات سروش، جلد دوم، ۱۳۷۰، صفحات ۵۸، ۹۸.

2. Houghton P. Herbal products, Agnus – castus, *The pharmaceutical Journal*, 1994; 253: 720 – 721.

۳. آزادبخت محمد. *رده‌بندی گیاهان دارویی*. انتشارات تیمورزاده (نشر طبیب). تهران، ۱۳۷۸، صفحات ۷ – ۲۵۵.

4. Russo M and Galleti CG. Medicinal properties and chemical composition of *Vitex agnus – castus*

L.: A review, *Acta. Hort. ISHS*. 1996; 426: 105 – 112.

5. Samara SP and srenivasan KK. Antiinflamatory and wound healling activities of 1209 – 1261.

۱۱. قاسمی دهکردی، نصـراله و طالـب امیرمهـدی *استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبـات موجـود در گیاهـان دارویـی شاخص*. نشر چوگان و دانشگاه علوم پزشکی اصفهان. ۱۳۸۰، صفحات ٦٣ – ۱۵۹.

12. Evans NP and et al. Estradiol requirments for induction and maintenance of the gonadotropin – releosing hormone surge: implication for neuroendocrine procassing of the stradiol signal, *Endocrinology*. 1997; 183: 5408 – 5414.

13. Neill JD. Freeman ME and Tilson SA. Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone by estrogen in the rat. *Endocrinol*. 1971; 89: 1448 – 1453.

the crude alcoholic extract and flavonoids of *vitex leucoxylon*. *Fitotropia*. 1990; 61: 263 – 264.

6. Bhargara SK. Antifertility effect of the flavonoids of the vitex negundo seeds in dogs. *phyt. Plant Med.* 1986: 188 – 197.

7. Bhargara SK. Antiandrogenic effects of the flavonoid – rich fraction of *Vitex negundo* seeds: A histological and biochemical study in dogs. *J. E. pharmacology*. 1989; 327 – 339.

8. Reynolds JBF. *Agnus – castus*, Martindale, The extrapharmacopoeia, 31ed., V. 102, 1996, P: 1670.

9. Fox RR and laird cw. Sexual cycles in: reproduction and breeding techniques for laboratory animals, E. S. E. Hafez (ed) lee & Febiger, philasdelphia. pp: 107 – 122.

10. Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM and Stainer P. Text book of physiology, 21th ed., W. B. Saunders company, philadelphia, Vol. 2, 1989, PP: