

تأثیر دوزهای مختلف عصاره آبی مرزنجوش بر روند اسپرماتوژنز و غلظت اسپرم در آسیب اکسیداتیو ناشی از کادمیوم در موش صحرایی

محمد مهدی فلاح^۱، مهدیه رئیس زاده^{۲*}، احسان سلیمی ناغانی^۳

چکیده

مقدمه: با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره مرزنجوش، هدف این مطالعه بررسی تأثیر دوزهای مختلف عصاره آبی مرزنجوش بر روند اسپرماتوژنز و غلظت اسپرم در آسیب اکسیداتیو کادمیوم بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی- مداخله‌ای، ۳۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل، گروه T1 کلرید کادمیوم به میزان ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم و برای گروه‌های T2، T3 و T4 علاوه بر کلرید کادمیوم به ترتیب عصاره آبی مرزنجوش ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۰ روز داخل صفاقی نیز تجویز شد. در روز آخر بعد از خون‌گیری و جداسازی سرم، میزان TCA (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم) اندازه‌گیری شد. تعداد اسپرم و درصد اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده در اپیدیدیم راست شمارش شد. بیضه راست و چپ نیز بعد از اندازه‌گیری وزن و قطر، برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید و انجام مطالعات هیستولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی با برنامه SPSS21 تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: بیشترین تعداد اسپرم و درصد سلامت غشاء در گروه کنترل و دوز ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره و کمترین در گروه دریافت کلرید کادمیوم (T1) بود ($P < 0/05$). بیشترین غلظت مالون دی‌آلدئید در گروه T1 و کمترین در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (T2) مشاهده شد. در ارتباط با TCA کمترین در گروه T1 و بیشترین در گروه T2 بود. بیشترین میانگین سلول‌های سرتولی، اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و لیدیک در گروه کنترل و دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره و کمترین در گروه T1 مشاهده شد. نتیجه‌گیری: عصاره آبی مرزنجوش با دوز تجویز مناسب می‌تواند تأثیر مثبت بر اسپرماتوژنز گذاشته و استرس اکسیداتیو کادمیوم را در بافت بیضه کنترل کند.

واژه‌های کلیدی: مرزنجوش، کادمیوم، اسپرماتوژنز، رت

۱- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، واحد سنج، دانشگاه آزاد اسلامی

۲- استادیار فارماکولوژی، گروه علوم پایه، واحد سنج، دانشگاه آزاد اسلامی

۳- استادیار علوم تشریح و جنین‌شناسی، گروه علوم پایه، واحد سنج، دانشگاه آزاد اسلامی

* (نویسنده مسئول); تلفن: ۰۹۱۲۳۴۷۴۴۵۷، پست الکترونیکی: vet_mr@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱/۱۷

مقدمه

کادمیوم یکی از عناصر سمی است که در محیط اطراف ما وجود دارد و با توجه به نیمه عمر طولانی آن، اثرات زیانباری روی بدن انسان می‌گذارد. این عنصر از طریق شستشو توسط آب، در رودخانه و دریاها وارد شده و سبب آلودگی اکوسیستم می‌شود (۱). از جمله کاربرد کادمیوم در صنعت می‌توان به استفاده آن در تولید باتری‌ها، رنگ‌ها، آب‌کاری فلزات، صنایع نظامی، کودها و مواد ثبات‌بخش در پلاستیک اشاره نمود. همچنین کادمیوم می‌تواند از طریق مواد مصرفی مانند غذا، آب، هوا و دخانیات وارد بدن انسان شود (۱). تحقیقات نشان می‌دهند که تجمع کادمیوم در بدن با ایجاد مسمومیت و آسیب به ارگان‌هایی مانند کبد، ریه و دستگاه تناسلی مردانه همراه است (۱).

خون‌ریزی شدید بافت بیضه، ادم و نکروز همراه با تخریب لوله‌های اسپرم ساز آسیب‌هایی است که در اثر تزریق کادمیوم، در بیضه ایجاد می‌شود (۲) تحقیقات نشان داده است که کادمیوم باعث کاهش تعداد اسپرم، کاهش تحرک اسپرم و آسیب غیرقابل برگشت به اپیتلیوم ژرمینال می‌شود (۳). همچنین مشخص شده که کادمیوم سبب کاهش تولید هورمون تستوسترون نیز شده است (۴).

القا استرس اکسیداتیو با افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن یکی از مکانیسم‌های مطرح در ایجاد آسیب به بافت بیضه توسط کادمیوم است. در این خصوص گزارش‌هایی مبنی بر ارتباط بین انباشتگی گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر ROS با کاهش تعداد و تحرک اسپرم وجود دارد (۵، ۲).

بدین ترتیب آلاینده‌های زیست‌محیطی از جمله کادمیوم با القا استرس اکسیداتیو می‌توانند بر روند تولید اسپرم و همچنین با تأثیرگذاری مستقیم بر روی اسپرم موجب ناباروری شوند؛ بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به خصوص آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با هدف حذف رادیکال‌های آزاد و همچنین تقویت سیستم دفاعی در دستگاه تناسلی می‌تواند به عنوان یک استراتژی مناسب برای مهار یا حداقل کاهش اثرات مخرب ناشی از استرس اکسیداتیو در جلوگیری از روند ناباروری مطرح باشد (۴).

مرزنجوش از گیاهان خوراکی رایجی است که در نقاط مختلف دنیا به عنوان ادویه استفاده می‌شود. مرزنجوش جنسی از خانواده نعناع و دارای گونه‌های متعددی است. تاکنون بررسی‌های بسیاری در مورد خواص بیولوژیک، فارماکولوژیک و آنالیز ترکیبات مرزنجوش انجام شده است. بر طبق گزارش‌های علمی معتبر، گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی قوی بر ضد عوامل پاتوژن انسانی و نیز عوامل فساد مواد غذایی است (۶). همچنین در خصوص خواص آنتی‌اکسیدانی در کنترل پراکسیداسیون لیپیدها مخصوصاً در کیفیت اسپرم، فرهادی و همکاران در سال ۱۳۹۴ افزودن عصاره اتانولی مرزنجوش به اسپرم گاو هولشتاین را سبب بهبود پارامترهای کیفی از جمله تحرک، سرعت حرکت، قابلیت زیستی، یکپارچگی غشا و همچنین کاهش پراکسیداسیون لیپیدی دانستند (۷). همچنین در سال ۱۳۹۵ دقیق کیا و همکاران افزودن عصاره مرزنجوش با خواص آنتی‌اکسیدانی به عنوان رقیق‌کننده اسپرم قوچ سبب کاهش سطح مالون دی‌الدئید و افزایش پارامترهای تحرک اسپرم اعلام نمودند (۸).

با توجه به آسیب استرس اکسیداتیو کادمیوم در بافت بیضه و اهمیت پتانسیل‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره مرزنجوش، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر دوزهای مختلف عصاره در اسپرماتوزن و تغییرات غلظت اسپرم در موش صحرایی نر بود.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات تجربی - مداخله بود که بر روی ۳۰ سرتهایی از جنس نر و نژاد ویستار با وزن 200 ± 30 گرم که در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی طی شرایط استاندارد ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آب سالم و کنسانتره استاندارد بدون محدودیت در اختیار حیوانات بود. همه مراحل اجرای این پژوهش مطابق با قواعد مربوط به اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت و مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه کردستان قرار گرفت.

موش‌های صحرایی به صورت تصادفی در ۵ گروه ۶ سری به ترتیب زیر تقسیم‌بندی و مورد آزمایش قرار گرفتند:

همچنین از عصاره بافت بیضه راست هم برای اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدئید (MDA) Malondialdehyde که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است با کمک روش تیوباربیتوریک اسید Thiobarbituric acid (TBA) استفاده شد (۱۱).

به ۵۰۰ میکرولیتر بافت هموژنه ۱/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی را برداشته به آن ۲ میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۰۶۷ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش گذاشته سپس ۲ میلی‌لیتر بوتانول به آن اضافه و بعد از ورتکس شدید، به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و سپس جذب محلول رویی صورتی‌رنگ را در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده می‌شود. غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۱ و ۱ و ۳ و ۳ تتراتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین و غلظت مالون دی آلدئید بر حسب نانومول بر میلی‌گرم محاسبه شد. محلول استاندارد مالون دی آلدئید در غلظت‌های ۲-۰/۲ میکرومولار در اسید سولفوریک ۱۰ درصد تهیه شد (۱۱).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم:

سنجش ظرفیت تمام آنتی‌اکسیدانی ارائه شده توسط بنزی و همکاران با نام روش Ferric-reducing ability of plasma (FRAP) استفاده شد (۱۰). در این روش، توانایی پلاسما در احیای یون فریک اندازه‌گیری می‌شود. در pH اسیدی، زمانی که کمپلکس FeIII-TPTZ به FeII احیا می‌گردد تولید رنگ آبی می‌نماید؛ که در طول موج ۵۹۳ بیشترین جذب نوری را دارد. مقادیر TCA با استفاده از نمودار استاندارد غلظت ۱۰۰-۱۰۰۰ میکرومول بر لیتر سولفات آهن اندازه‌گیری شد (۱۲).

روش تهیه عصاره آبی مرزنجوش:

بعد از جمع‌آوری گیاه مرزنجوش از اراضی کشاورزی کرمانشاه، توسط مرکز هرباریوم دانشگاه کردستان مورد تایید قرار گرفت. پس از جداسازی برگ گیاه و خشک کردن در سایه، نمونه به صورت پودر درآمده به نسبت وزنی-حجمی ۱/۱۰۰ با آب گرم ۹۰ درجه مخلوط شد. سپس در حمام آب گرم ۴۵ درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس صاف شده و در

گروه کنترل (C) بدون تزریق (دریافت آب و تغذیه استاندارد) گروه (T1) کلرید کادمیوم ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم ساخت شرکت مرک (Lot number: FN1035040) را داخل صفاقی در روز دوم و سپس تجویز سالیین نرمال به مدت ۱۰ روز

گروه (T2) کلریدکادمیوم ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی در روز دوم و سپس عصاره مرزنجوش ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۰ روز

گروه (T3) کلریدکادمیوم ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی در روز دوم و عصاره مرزنجوش ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۰ روز

گروه (T4) کلریدکادمیوم ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم داخل صفاقی و عصاره مرزنجوش ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۱۰ روز (۹) در روز دهم موش‌ها وزن‌گیری شدند. خون‌گیری از قلب حیوان و جداسازی سرم برای اندازه‌گیری غلظت آنتی‌اکسیدانی سرم Total Capacity Antioxidant (TCA) انجام شد. سپس حیوانات با اوردوز تیوپنتال به روش انسانی معدوم شدند.

به دنبال خروج بیضه چپ و اندازه‌گیری وزن آن، اپیدیدیم در دنباله آن با قیچی جدا شد. برای خروج اسپرم‌ها، دم اپیدیدیم را در ۲ میلی‌لیتر سالیین نرمال کاملاً شستشو و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ نگهداری شد.

برای ارزیابی سلامت غشا اسپرم از آزمون HOS استفاده شد (روش اسلیوا و ماکورا به صورتی که ۱۰ میکرولیتر اسپرم به ۰/۴ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و مدت ۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ نگهداری شد. اسپرم‌های با دم پیچ‌خورده سالم در نظر گرفته شد (۱۰). برای تعیین غلظت اسپرم ۵۰ میکرولیتر اسپرم به ۱ میلی‌لیتر فرمالین اضافه‌شده و سپس با لام هموسیستمتر اسپرم‌ها شمارش شد (۱۰).

بیضه چپ برای تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی بافتی با هماتوکسین اتوزین مورد استفاده واقع شد. شمارش سلول‌های مختلف رده اسپرماتوژنز از جمله اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیست‌ها (اولیه و ثانویه)، سلول‌های سرتولی و لیدیک سل‌ها با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ انجام گردید. اعداد به دست آمده به صورت میانگین تعداد سلول‌ها در هر گروه در نظر گرفته شد.

و سپس گروه T2 (عصاره ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ۲۳۰/۳۳ گرم مشاهده شد. کمترین وزن در گروه دریافت کادمیوم T2 ۱۹۵/۶۶ گرم دیده شد. اختلاف وزن موش‌ها در روز آخر در گروه T3 با گروه کنترل منفی (سالین نرمال) و گروه دریافت‌کننده کادیوم ۱۹۵/۶۶ گرم معنی‌دار بود. همچنین این اختلاف وزن در گروه دریافت کلرید کادمیوم با تمام گروه‌های تحت آزمایش نیز در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار است.

بر اساس نتایج موجود در جدول ۱ مربوط به تغییرات هیستومورفومتریکی بیضه‌ها، بیشترین وزن بیضه راست و چپ مربوط به گروه کنترل بوده و این اختلاف وزن بیضه‌ها در گروه کنترل با سایر گروه‌های آزمایش معنی‌دار است. در ارتباط با قطر بیضه راست و چپ بیشترین مربوط به گروه کنترل با متوسط ۱/۷۶ و ۱/۶۶ بوده و این اختلاف با سایر گروه‌های آزمایش در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار شد.

بر اساس نتایج موجود در جدول ۱ در ارتباط با تغییرات هیستومورفومتریکی بیضه‌ها، بیشترین وزن بیضه راست و چپ مربوط به گروه کنترل بوده و این اختلاف وزن بیضه‌ها در گروه کنترل با سایر گروه‌های آزمایش معنی‌دار است. در ارتباط با قطر بیضه راست و چپ بیشترین مربوط به گروه کنترل با متوسط ۱/۷۶ و ۱/۶۶ بوده و این اختلاف با سایر گروه‌های آزمایش در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار شد.

جدول ۱: بررسی تغییرات هیستومورفومتریکی بیضه‌ها در گروه‌های مورد آزمایش

پارامترها گروه‌ها	وزن موش در روز اول (گرم)	وزن موش در روز آخر (گرم)	وزن بیضه سمت راست (گرم)	وزن بیضه سمت چپ (گرم)	قطر بیضه سمت راست (سانتی‌متر)	قطر بیضه سمت چپ (سانتی‌متر)
گروه کنترل	۲۲۰/۳۳±۴/۱۵	۲۵۵/۶۶±۱/۸۷ a,b,c,d,e	a, c,d,e ۱/۴۵±۰/۰۰۹	a,c,d,e ۱/۴۱±۰/۰۱۷	a,c,d,e ۱/۷۶±۰/۰۲۱	a,c,d ۱/۶۶±۰/۰۲۱
گروه T1	۲۱۴/۶۶±۱/۲۸	۱۹۵/۶۶±۰/۷۶ a,f,g,h,i	a ۰/۷۵±۰/۰۶۲	a ۰/۷۹±۰/۰۶۶	a ۱/۲۰±۰/۰۳۶	a ۱/۲۰±۰/۰۳۶
گروه T2	۲۲۲±۶/۷۰	۲۱۷±۰/۹۶ d,h	d ۰/۷۴±۰/۰۶۷	d ۰/۶۹±۰/۰۴۳	d ۱/۲۶±۰/۰۵۵	d ۱/۳۶±۰/۰۴۲
گروه T3	۲۲۴/۳۳±۲/۹۲	۲۳۰/۳۳±۴/۰۲ c,g	c ۰/۷۵±۰/۰۶۰	c ۰/۷۲±۰/۰۳۹	c ۱/۳۰±۰/۰۳۶	c ۱/۳۰±۰/۰۳۶
گروه T4	۲۳۲±۵/۵۱	۲۲۷/۳۳±۴/۷۵ e,i	e ۰/۶۴±۰/۰۲۰	e ۰/۶۷±۰/۰۲۳	e ۱/۳۳±۰/۰۲۱	e ۱/۴۳±۰/۰۸۴

گروه کنترل: بدون درمان گروه T1: کلرید کادمیوم ۲mg/kg گروه T2: عصاره ۵۰۰mg/kg همراه کلرید کادمیوم
گروه T3: عصاره ۲۵۰mg/kg به همراه کلرید کادمیوم گروه T4: عصاره ۱۲۵mg/kg به همراه کلرید کادمیوم
حروف لاتین مشابه به صورت ستونی نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه مربوطه است.
معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

T2 وجود داشت. اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه T1 با بقیه گروه‌های تحت آزمایش وجود داشت. غلظت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه T2 بیشترین غلظت ۱۱۹۸/۹۱ میکرومول بر میلی‌لیتر بوده که اختلاف آماری معنی‌داری با گروه T1 به غلظت ۷۹۶/۴ میکرومول بر میلی‌لیتر مشاهده شد.

در ارتباط با مالون دی‌آلدئید بیشترین غلظت در گروه دریافت‌کننده کلریدکادمیوم با متوسط ۱/۴ میکرومول بر میلی‌لیتر و کمترین در گروه T2 با ۰/۹۳ میکرومول بر میلی‌لیتر شد. غلظت مالون دی‌آلدئید در گروه کنترل ۰/۹۷ میکرومول بر میلی‌لیتر آزمایش ۴، ۳، ۲، ۱ به ترتیب ۰/۹۸، ۰/۹۳ و ۱/۴ میکرومول بر میلی‌لیتر بود. بیشترین مقدار در گروه دریافت‌کننده کلریدکادمیوم و کمترین در گروه

جدول ۲: بررسی غلظت مالون دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های تحت آزمایش

TCA μmol/ml	MDA μmol/ml	پارامترها گروه‌ها
۱۱۰۲/۲۵±۶۲/۰۷۲	^a ۰/۹۷±۰/۰۰۷	گروه کنترل
^a ۷۹۶/۴۱±۴۰/۰۷۶	^{a,b,c,d,e} ۱/۴±۰/۰۱۸	گروه T1
^a ۱۱۹۸/۹۱±۵۱/۴۵	^d ۰/۹۳±۰/۰۳۰	گروه T2
۹۵۵/۴۱±۶۶/۰۷۵	^c ۰/۹۸±۰/۰۳۴	گروه T3
۸۷۴/۲۵±۳۳/۳۹	^e ۱/۰۱±۰/۰۱۲	گروه T4

گروه کنترل: بدون درمان گروه T1: کلرید کادمیوم ۲mg/kg
گروه T3: عصاره ۲۵۰mg/kg به همراه کلریدکادمیوم
گروه T2: عصاره ۵۰۰mg/kg به همراه کلریدکادمیوم
گروه T4: عصاره ۱۲۵mg/kg به همراه کلریدکادمیوم
حروف لاتین مشابه به صورت ستونی نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه مربوطه است.
معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

T1 تقریباً ۱۱ درصد، گروه کنترل ۶۸ درصد و گروه T2 تقریباً ۶ درصد بود. این اختلاف بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها معنی‌دار است. نتایج نشان می‌دهد که در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره، درصد سلامت غشا کاهش می‌دهد.

غلظت اسپرم در گروه کنترل با بیشترین مقدار $10^6 \times 117$ است. بعد از گروه کنترل بیشترین تعداد اسپرم در گروه T4 با $10^6 \times 21/66$ بود. اختلاف آماری بین گروه کنترل با گروه‌های مختلف T1، T3 و T4 معنی‌دار شد. درصد سلامت غشاء در گروه T4، T3 تقریباً ۳۳ درصد، گروه

جدول ۳: بررسی غلظت اسپرم و درصد سلامت غشاء اسپرم در گروه‌های تحت آزمایش

درصد سلامت غشا	غلظت اسپرم $\times 10^6$	پارامترها گروه‌ها
^{a, c, d, e} ۶۸/۳۳±۱/۰۵	^{a, c, d, e} ۱۱۷/۶۶±۲/۷۴	گروه کنترل
^{a, f, g, h} ۱۱/۶۶±۳/۸	^{a, f, g, h} ۳±۰/۹۶	گروه T1
^{d, i, k, l} ۶/۶۶±۴/۲۱	^{d, i, k} ۴/۳۳±۲/۷۴	گروه T2
^{c, g, k} ۳۳/۳۳±۴/۵۹	^{c, g, i} ۱۹/۶۶±۰/۷۶	گروه T3
^{e, h, l} ۳۳/۳۳±۴/۵۹	^{e, h, k} ۲۱/۶۶±۳/۵۰	گروه T4

گروه کنترل: بدون درمان گروه T1: کلرید کادمیوم ۲mg/kg
گروه T3: عصاره ۲۵۰mg/kg به همراه کلریدکادمیوم
گروه T2: عصاره ۵۰۰mg/kg به همراه کلریدکادمیوم
گروه T4: عصاره ۱۲۵mg/kg به همراه کلریدکادمیوم
حروف لاتین مشابه به صورت ستونی نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه مربوطه است.
معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.

دیده شد. تغییرات میانگین در گروه کنترل با بقیه گروه‌ها معنی‌دار شد.

در ارتباط با سلول‌های اسپرماتوسیتی که شامل سیت اولیه و سیت ثانویه بود بیشترین تعداد اسپرماتوسیت‌ها در گروه کنترل برابر ۱۹۶/۳۳، گروه T3 برابر با ۳۶/۶۷، گروه T3 با میانگین ۱۷/۳۳، گروه T4 برابر با ۱۳ و گروه T1 برابر با ۷/۳۳ را نشان داد. این اختلاف بین گروه کنترل با گروه T1, T2, T3, T4 معنی‌دار شد. در خصوص سلول‌های لیدیک کمترین تعداد در گروه T1 و بیشترین در کنترل دیده شد.

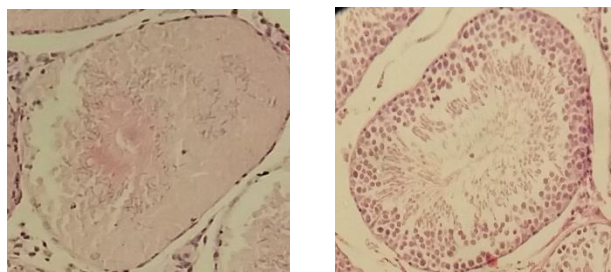
طی مطالعات هیستولوژی بافتی، سلول‌های مختلف بافت بیضه (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، سرتولی و لیدیک) را در گروه‌های مختلف آزمایش نشان می‌دهد. بر اساس نتایج موجود بیشترین سلول‌های سرتولی به عنوان سلول‌های مقاوم و پشتیبان بافت بیضه در گروه کنترل بیشترین میانگین حدود ۱۵ و گروه T1 کمترین ۶ را نشان داد. سلول‌های اسپرماتوگونی (رده اول سلول‌های جنسی) به ترتیب بیشترین به کمترین در گروه‌های کنترل، T3، T2، T4 و T1 میانگین ۵۹/۳۳، ۳۸، ۱۷/۶۶، ۱۲/۶۶، ۱۱/۶۶ و ۱۱/۳۳

جدول ۴: تغییرات سلول‌های مختلف بافت بیضه در گروه‌های مورد آزمایش

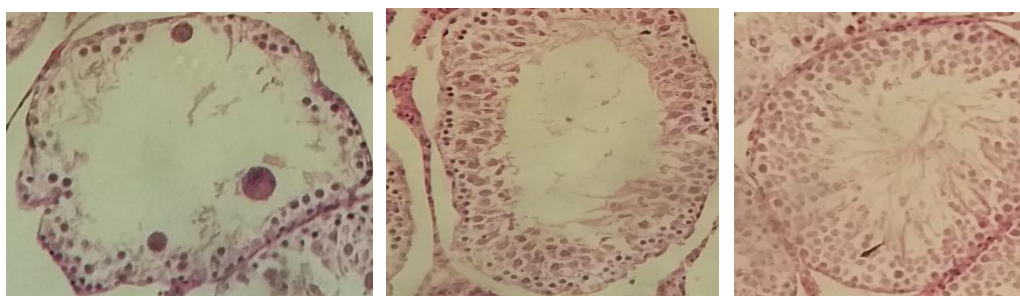
سلول‌های لیدیک	اسپرماتوسیت ۱ و ۲	اسپرماتوگونی	سرتولی	پارامترها گروه‌ها
a,c,d,e ۷۷۵/۸۳±۳/۵۳	a,c,d,e ۱۹۶/۳۳±۲/۰۷	a,c,d,e ۵۹/۳۳±۱/۶۴	a,c,d,e ۱۵/۳۳±۰/۴۲	گروه کنترل
a,f,g,h,i ۴۲۳/۸۳±۷/۶۱	a,f,g,h ۷/۳۳±۰/۴۲	a,f,g ۱۱/۳۳±۰/۵۵	a,f,g ۶±۰/۳۶	گروه T1
d, h,k,m ۴۹۸/۱۶±۲/۷۴	d,g,k,l ۱۷/۳۳±۰/۲۱	d,g,i,k,m ۱۷/۶۶±۰/۹۱	d,k,m ۷±۰/۷۳	گروه T2
c,g,j,m,n ۵۸۵±۳/۹۲	c,f,i,l,m ۳۶/۶۷±۱/۷۲	c,f,h,k,l ۲۸±۱/۳۱	c,f,h,k,l ۱۲±۰/۷۳	گروه T3
e,i, l,n ۴۹۳/۳۳±۶/۲۹	e,h,m ۱۳±۰/۷۳	e,l,m ۱۱/۶۶±۰/۴۲	e,g,i,l,m ۲/۳۳±۰/۲۱	گروه T4
گروه کنترل: بدون درمان گروه T1: کلرید کادمیوم ۲mg/kg گروه T3: عصاره ۲۵۰mg/kg به همراه کلرید کادمیوم گروه T2: عصاره ۵۰۰mg/kg به همراه کلرید کادمیوم گروه T4: عصاره ۱۲۵mg/kg به همراه کلرید کادمیوم				
حروف لاتین مشابه به صورت ستونی نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین دو گروه مربوطه است. معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ در نظر گرفته شده است.				

تصاویر ۲ به بررسی نمایی از برش عرضی در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره مرزنجوش با دوزهای مختلف پرداخته شده است.

همچنین در تکمیل اطلاعات جداول در تصاویر ۱ مقایسه نمایی از برش عرضی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه کنترل، گروه دریافت کلرید کادمیوم بدون تیمار عصاره آبی مرزنجوش و در



شکل ۱: سمت راست برش عرضی یک لوله اسپرم‌ساز در گروه کنترل، سمت چپ لوله اسپرم‌ساز در گروه T1 دریافت کلرید کادمیوم



شکل ۲: برش عرضی یک لوله اسپرم ساز به ترتیب از سمت راست به چپ در گروه T3، T2، T4

بحث

آلاینده‌های زیست‌محیطی از جمله کادمیوم با ایجاد رادیکال‌های آزاد و القا استرس اکسیداتیو می‌توانند بر روند تولید اسپرم و همچنین پارامترهای مختلف آن به صورت مستقیم اثرگذاری داشته و سبب ناباروری شود (۱۴). برای جلوگیری از استرس اکسیداتیو هر دو سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی در بیضه‌ها هستند (۱۵). از طرف دیگر عصاره گیاه مرزنجوش با پتانسیل‌های آنتی‌اکسیدانی خاص از جمله ترکیبات فنلی مخصوصاً اسیدهای فنلی و فلاوونوئیدی می‌توانند در کنترل آسیب‌های رادیکال‌های آزاد عملکرد ویژه‌ای از خود نشان دهند.

بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر وزن موش‌ها در گروه دریافت کلرید کادمیوم نسبت به سایر گروه‌ها کاهش و این کاهش نیز در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار بود به نحوی که می‌توان گفت کادمیوم می‌تواند سبب استرس اکسیداتیو، کاهش اشتها و به دنبال آن کاهش وزن حیوان شود.

در ارتباط با مالون دی‌آلدئید شاخص استرس اکسیداتیو بر اساس نتایج تحقیق حاضر، بیشترین غلظت در گروه دریافت کلرید کادمیوم و کمترین در گروه (T2) عصاره ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی بود و این اختلاف در سطح $P < 0.05$ معنی‌دار بود. به نحوی که می‌توان گفت بر اساس نتایج مطالعات قبل نیز کادمیوم با ایجاد رادیکال آزاد و القای استرس اکسیداتیو باعث آسیب به بافت بیضه می‌شود. در گروه T2 بیشترین میزان غلظت آنتی‌اکسیدانی سرم را در نتایج به دست آمد که بر این اساس با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم،

استرس اکسیداتیو تا حدی کنترل شده است. مرزنجوش سرشار از آنتی‌اکسیدان قوی است که می‌تواند فعالیت رادیکال‌های آزاد را خنثی (۱۶، ۱۷). بررسی آثار فارماکولوژیک مرزنجوش ترکیبات فنلی به خصوص اسیدهای فنلی و فلاوونوئیدها به عنوان عوامل مؤثر احتمالی مطرح شده است (۱۸).

در تحقیقی دیگری که توسط زربان و همکاران با عنوان ارزیابی اثر آنتی‌اکسیدان ۲۸ مورد از گیاهان دارویی ایران انجام شده اثر آنتی‌اکسیدانی گیاهان به ترتیب در مرزنجوش، گل سرخ، مریم‌گلی، داروآش، اکلیل‌الملک و برگ گردو بیشتر بود. به طوری که گیاهان دارویی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌تواند به خوبی همولیز گویچه‌های قرمز ایجاد شده توسط H₂O₂ را خنثی نمایند (۱۹).

در ارتباط با غلظت اسپرم گروه تجویز کادمیوم (T1) کمترین میزان را نشان داد. در گروه‌های تیمار با عصاره در دوز ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین تعداد اسپرم شمارش شد. در ارتباط با درصد سلامت غشاء در ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشترین تعداد اسپرم با سلامت غشا مشاهده شد. این در حالی است که در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از نظر غلظت اسپرم و درصد سلامت غشاء اسپرم، درصد پابینی را نسبت به گروه‌های دیگر داشت. این مسئله با توجه به غلظت بالای آنتی‌اکسیدانی سرم و کاهش مالون دی‌آلدئید در این گروه می‌تواند موید مفید بودن غلظت فلاوونوئیدها و ترکیبات فنلی بر غلظت اسپرم و درصد سلامت آن در دوز مناسب باشد.

می‌شوند (۲۳)؛ مانند کنترل نابرابری ناشی از استرس اکسیداتیو آلومینیوم در اسپرم قوچ با استفاده از عصاره سیلی مارین که سبب کنترل و کاهش تمامیت غشاء پلاسمایی و آکروزوم اسپرم می‌شود (۲۴).

در مطالعات اخیر فرهادی و همکاران و همچنین دقیق کیا و همکاران، استفاده از عصاره اتانولی مرزنجوش به عنوان افزودنی به مایع رقیق‌کننده اسپرم در گاور هولشتاین و قوچ، بر پارامترهای کیفی اسپرم اثر مثبت داشته و سبب کاهش استرس اکسیداتیو و کنترل پراکسیداسیون لیپیدها در اسپرم شده است (۷،۸)؛ که با نتایج بیوشیمیایی مالون دی‌الدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم در آسیب اکسیداتیو بافت بیضه موش در تحقیق حاضر هماهنگی وجود دارد.

مکانیسم دفاعی بدن در مقابل این رادیکال‌های آزاد ترشح عوامل آنتی‌اکسیدانی درون‌زا همچون آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز است. افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال سبب کاهش این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی درون‌زا شده و بدین وسیله سبب افزایش آپوپتوز سلولی می‌گردد. دوز پایین فلاونوئیدها سبب افزایش عملکرد آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا شده در حالی که دوز بالای آن‌ها سبب مهار عملکرد آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد شده و بدین وسیله سبب مرگ سلولی می‌گردند (۲۵).

سلینو و همکاران در سال ۲۰۱۱ در پژوهشی اعلام نمودند که در رده‌های سلولی اسپرماتوژنز، اسپرماتوگونی‌ها از همه مقاوم‌تر و سلول‌های اسپرماتید از همه حساس‌تر به گونه‌های ROS می‌باشند (۲۶).

در مطالعه دیگر در سال ۲۰۱۲ انجام شد، اعلام شد که استرس اکسیداتیو باعث ایجاد ROS و مهار اسپرماتوژنز می‌شود به نحوی که فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز کاهش یافته و روند پرولیفراسیون سلول‌های اسپرماتوگونی به این مسئله حساس و سبب آپوپتوز می‌شود (۲۷). به نحوی که نتایج پژوهش اخیر در تغییرات سلول‌های مختلف رده اسپرماتوژنز با مطالعه اخیر هم‌راستا بود.

در راستای تکمیل مطالعه اخیر می‌توان به اندازه‌گیری سایر

در پژوهش کاظمی اشاره به تغییرات هورمون FSH شده است که با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی عصاره اتانولی مرزنجوش تغییرات هورمون به ترتیب 0.372 ± 0.026 ، 0.31 ± 0.031 و 0.383 ± 0.026 بوده است به نحوی که در دوز ۴۰ میلی‌گرم میزان هورمون کاهش یافته و احتمالاً می‌تواند تأثیر معکوس بر اسپرماتوژنز نیز داشته باشد (۲۰). اگرچه تحقیق حاضر با پژوهش کاظمی هم‌راستا است اما تفاوت مدت‌زمان پژوهش، نوع عصاره و سرپال دوز را باید مدنظر قرار داد.

در ارتباط با تغییرات سلول‌های مختلف رده اسپرماتوژنز کمترین در گروه تجویز کادمیوم بود. بیشترین تعداد سلول‌های سرتولی در دوز ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره آبی مرزنجوش مشاهده شد. در ارتباط با سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه نیز روند به همین ترتیب بوده است. به نحوی که با افزایش دوز در گروه T2 (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) میانگین سلول‌های مختلف کاهش را نشان می‌دهد. اختلافی که بین اسپرم با رده‌های دیگر سلولی در مثبت بودن اثر غلظت‌های عصاره مشاهده شد شاید به سبب اختلاف در حساسیت سلول‌های مختلف رده‌های اسپرماتوژنز باشد. به نحوی که اسپرم نسبت به رده‌های قبل‌تر از خود به اثرات توکسیک غلظت‌های بالای ترکیبات فلاونوئیدی حساس‌تر بوده است.

در بررسی آثار فارماکولوژیک مرزنجوش ترکیبات فنلی به‌خصوص اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها به عنوان عوامل مؤثر احتمالی مطرح شده‌اند (۲۱).

اگرچه فلاونوئیدها در غلظت پایین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی عمل می‌کنند ولی نشان داده شده است که غلظت بالای فلاونوئیدها سبب ایجاد رادیکال‌های آزاد و آپوپتوز سلولی می‌شوند (۲۲) رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون لیپیدی شده که منجر به آسیب غشای سلولی، تغییر فشار اسمزی و تورم سلولی شده و در نهایت مرگ سلولی رخ می‌دهد. علاوه بر این رادیکال‌های آزاد واسطه‌های التهابی را جذب نموده سبب ایجاد واکنش التهابی و آسیب بافتی

مصرف عصاره مرزنجوش با دوز مناسب می‌تواند تأثیر مثبت بر اسپرماتوژنز گذاشته و در شرایط وجود مواد شیمیایی القاکننده رادیکال آزاد مانند کلریدکادمیوم روند اسپرماتوژنز را اصلاح نماید.

سیاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دکتری حرفه‌ای دامپزشکی است. از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج به جهت تایید و تصویب آن قدردانی می‌شود.

فاکتورهای استرس اکسیداتیو از جمله آنزیم گلوکوتاتیون اکسیداز، کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز و همچنین بررسی سایر پارامترهای کیفی و مولکولی مربوط به اسپرم و ناهنجاری‌های مورفورلوژیک آن نیز پرداخت.

نتیجه‌گیری

نظر به این که در تجویز آنتی‌اکسیدان‌ها میزان دوز مصرفی بسیار مهم است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد که

References:

1. Siu ER, Mruk DD, Porto CS, Cheng CY. *Cadmium-induced testicular injury*. Toxicol Appl Pharmacol 2009; 238: 240-49.
2. Aziz DM, Ahlswede L, Enbergs H. *Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability*. Theriogenology 2005; 64: 1350-56.
3. Aitken RJ, Baker MA. *Oxidative stress, sperm survival and fertility control*. Mol Cell Endocrinol 2006; 250: 66-69.
4. Bernard A. *Cadmium & its adverse effects on human health*. Indian J Med Res 2008; 128: 557-64.
5. Arabi R. *Cadmium as etiology sperm dysfunction in Holstein bulls*. Iran J Vet Res 2006; 7: 29-36.
6. Mambini T, Mambini M, Aghaye A. *The pharmacological effects of Marjoram (origanum spp)*. J of Med Plants 2009; 8 (1): 18-35.
7. Farhadi R, Daghigh Kia H. *The effect of ethanol extract of sage Sahandi as natural antioxidants on quality parameters thawing frozen semen of Holstein cows*. Res of animal product j 2015; 6(12): 79-86.
8. Daghigh Kia H, Sadeghi Sadegh, Abad F, Mohamadzadeh H, Vaseghi Dodran H, Ashrafi I. *The effect of Origanum Vulgare extract as natural antioxidant on quality cryopreserved ram sperm*. Animal sci res j 2016; 26(4): 111-20
9. Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal BK, Thakur, Ahnn J. *Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species*. Mol Cells 2004; 17: 132-39.
10. Sliwa L, Macura B. *Evaluation of cell membrane integrity of spermatozoa by hypoosmotic swelling test-water test in mice after intraperitoneal diadzein administration*. Archives Androl 2005; 51: 443-48.
11. Satoh K. *Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method*. Clin Chim Acta 1978; 90: 37-43.
12. Benzie IFF, Strain JJ. *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay*. Anal Biochem 1996; 239: 70-76.

13. Abbasnejad M, Abbasnejad A, Afarinesh M, Hassibi N. *Evaluation of origanum leaves extract on spatial learning in male rats*. J Physio and Pharma 2006; 10: 143-50
14. Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal BK, Thakur, Ahnn J. *Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species*. Mol Cells 2004; 17: 132-39.
15. Nostro A. *Susceptibility of Methicillin resistant Staphylococci to Oregano Essential Oil Carvacrol and Thymol*. FEMS Microbiol Lett 2004; 230: 191-5.
16. Khan A, Bashir S, Khan SR, Gilani AH. *Antiuro lithic activity of Origanum vulgare is mediated through multiple pathways*. BMC Complement Altern Med 2011; 11: 96.
17. Faleiro L, Miguel G, Gomes S, Costa L, Venâncio F, Teixeira A, et al. *Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from Thymbra capitata L. (Cav.) and Origanum vulgare L.* J Agric Food Chem 2005; 53(21): 8162-8.
18. Afsharypour S, Sajjadi SE, Erfan-Manesh M. *Volatile constituents of Origanum vulgare ssp.viride (syn.O.heracleoticum) from Iran*. Planta Med 1997; 63: 179-80.
19. Kulisic T, Krisko A, Dragovic-Uzelac V, Milos M, Pifat G. *The effects of essential oils and aqueous tea infusions of oregano (Origanum vulgare L. spp. hirtum), thyme (Thymus vulgaris L.) and wild thyme (Thymus serpyllum L.) on the copper-induced oxidation of human low-density lipoproteins*. Int J Food Sci Nutr 2007; 58: 87-93.
20. Kazemi P, Johari H, Sharifi A, Zeraatpishe A. *Androgenic effect of Marjoram extract the hormones pituitary - gonadal axis in adult male Wistar rats*. J of Med Sci 2012; 14(6): 89-96
21. El Babili F, Bouajila J, Souchard JP, Bertrand C, Bellvert F, Fouraste I, et al. *Oregano: chemical analysis and evaluation of its antimalarial, antioxidant, and cytotoxic activities*. J Food Sci 2011; 76 (3): C512-8.
22. Watjen W, Michels G, Steffan B, Niering P, Chovolou Y, Kampkötter A, et al. *Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis*. J Nutr 2005; 135(3): 525-31.
23. Halliwell B. *Free radicals, aging and diseases. In oxygens radicals and human disease*. Int J Biomed Sci 1987; 107: 528
24. Momeni HR, Sepehri H, Yosefi M. *Effect of Silymarin on Plasma Membrane and Acrosome of Sperm Treated with Aluminum Chloride*. AMUJ 2015; 18(97): 71-80.
25. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. Am J Clin Nutr 2001; 74 (4): 418-25
26. Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Ohta, T, Tozawa Y, Iwai T, et al. *Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase*. PLoS One 2011; 6 (2): 160-69.
27. Celino FT, Yamaguchi-Shimizu S, Miura C, Miura T. *Proliferating spermatogonia are susceptible to reactive oxygen species attack in Japanese eel (Anguilla japonica)*. Biol Reprod 2012; 28(3): 70-87.

The Different Doses of Aqueous Extract of Marjoram Effects on Spermatogenesis and Sperm Concentration in Cadmium-induced Oxidative Damage in Rats

Mohammad Mehdi Falah¹, Mahdieh Raeeszadeh^{*2}, Ehsan Salimi Naghani³

¹ Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

^{2,3} Department of Basic Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

Received: 21 Nov 2016

Accepted: 6 Apr 2017

Abstract

Introduction: The purpose of this study was to investigate the effect of different doses of aqueous extract of marjoram on spermatogenesis and sperm concentration in cadmium oxidative damage due to the antioxidant quality of extract.

Methods: In the interventional- experimental study, 30 male Wistar rats were randomly divided into 5 groups. Control group, T1, T2, T3 and T4 groups. In the group of T1, 2mg/kg Chloride Cadmium was administered intraperitoneally; T2, T3 and T4 groups, in addition to the chloride cadmium the extract of marjoram at 500, 250 and 125 mg/kg intraperitoneal was administered, respectively, for 10 days. Then, on the last day, after blood collection and separation of serum, TCA was measured. Sperm numbers and percentage of sperm twisted tail were counted in the right epididymis. After measuring the right and left testicular weight and diameter, malondialdehyde and histological studies were examined. The data were analyzed by one way ANOVA analysis and Tukey's test using SPSS 21.

Results: The highest number and percentage of sperm membrane integrity was in the control group and in T4 (doses of 125 mg/kg of extract) and the lowest in the group receiving cadmium (T1) and this difference was significant ($P < 0.05$). The highest concentration of MDA was in the T1 group and the lowest in the group of the dose of 500 mg/kg (T2), respectively. The TCA concentration was the lowest in T1 and highest in T2. The most average sertoli, spermatogonia, spermatocets and Leydic cells was in the control group and the group of 250 mg/kg doses of extract, but the lowest was observed in T1.

Conclusion: The aqueous extract of marjoram with an appropriate dose can have a positive effect on spermatogenesis and control testicular tissue oxidative stress by cadmium.

Keywords: Marjoram; Cadmium; Spermatogenesis; Rat

This paper should be cited as:

Falah MM, Raeeszadeh M, Salimi Naghani E. The Different Doses of Aqueous Extract of Marjoram Effects on Spermatogenesis and Sperm Concentration in Cadmium-induced Oxidative Damage in Rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(3): 230-40.

*Corresponding author: Tel: 09123474457, email: vet_mr@yahoo.com