Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 20(127): 74-89

The Effect of Alcoholic Extract of *Anethum graveolens* Seed on the Changes of Testis Tissue, Sperm Parameters in Hypercholesterolemic Male Rats

Farah Farokhi[1*], Samira Riazi[2]

1. Associate Professor, Ph.D. in Anatomy, Department of Biology, University of Urmia, Urmia, Iran
2. MS.c of Histology and Embryology, Department of Biology, University of Urmia, Urmia, Iran

Received: 28 Oct 2017, Accepted: 4 Dec 2017

Abstract

Background: For treating hypercholesterolemic in traditional medicine, *Anethum graveolens* seeds are used that reduce blood glucose, cholesterol and triglyceride. The aim of this study is to investigate the effect of hydroalcoholic extract of *Anethum graveolens* seed on the changes of testis tissue, sperm parameters in hypercholesterolemic male rats.

Materials and Methods: In this study, 30 adult male rats were randomly divided into 5 groups of 6: control, hypercholesterolemic, hypercholesterolemic +alcoholic extract of *Anethum graveolens* seed 500 mg/kg/day, hypercholesterolemic +alcoholic extract of *Anethum graveolens* seed 300 mg/kg/day, healthy+alcoholic extract of *Anethum graveolens* seed 500 mg/kg/day. After treatment for 45 days, rats were weighed and after the dissection, sperm samples were collected from the tail epididymal and sperm parameters were studied. The testicular specimens were transferred to formalin and stained with hematoxylin-eosin. Data were analyzed using one-way ANOVA and Turkey's post- hoc tests and significant level ($p<0.05$) was considered.

Results: In this research, in the hypercholesterolemic rats, the testicular weight was increased, but the diameter of the semnifer tubes, tubal differentiation and spermiogenese, and sperm viability were decreased compared to control ($p<0.05$), but in hypercholesterolemic treatment with *Anethum graveolens* seed these parameters were improved.

Conclusion: According to the results of this study, *Anethum graveolens* seed has positive effects on testicular tissue and sperm parameters in hypercholesterolemic mice.

Keywords: *Anethum graveolens*, Hypercholesterolemia, Male rat, Sperm parameters

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, University of Urmia, Urmia, Iran
Email: f.farokhi@urmia.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال ۲۰، شماره ۱۰ (شماره پیاپی ۱۲۷)، دی۱۳۹۶، ۸۹-۷۴

تأثیر عصاره‌ی الکلی بذر شوید بر تغییرات بافتی بیضه و پارامترهای اسپرمی در موش‌های رت نر هایپرکلسترولمی

فرح فرخی[1*]، سمیرا ریاضی[2]

۱. دانشیار، دکتری علوم تشریح، گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ، ایران
۲.کارشناس ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ،ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۶، تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: در طب سنتی، برای درمان هایپرکلسترولمی از بذر شوید که کاهنده ی قند خون، کلسترول و تری گلیسرید است، استفاده می شود. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات عصاره ی هیدرو الکلی بذر شوید بر ساختار بافت بیضه و پارامترهای اسپرمی در موش های رت نر هایپرکلسترولمی می باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۳۰ رت نر بالغ به طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند: کنترل، هایپرکلسترولمی، هایپرکلسترولمی + روزانه ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم شوید، هایپر کلسترولمی + روزانه ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم شوید، سالم + روزانه ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم شوید. بعد از اتمام تیمار به مدت ۴۵ روز، موش ها توزین و پس از تشریح، اسپرم ها از دم اپیدیدیم جمع آوری و پارامترهای اسپرمی مطالعه شد. نمونه‌های بیضه به داخل فرمالین منتقل گردیده و با هماتوکسیلین – ائوزین رنگ آمیزی شدند. تحلیل داده ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنووای یک طرفه و تست تعقیبی توکی انجام گرفت و سطح معنی داری $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این بررسی، در موش های هایپرکلسترولمی وزن بیضه افزایش داشت، اما قطر لوله های سمنی فر، ضریب تمایز لوله ای واسپرمیوژنز، زیست پذیری اسپرم نسبت به کنترل به طور معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) کاهش پیدا کرد؛ ولیکن، این پارامترها درتیمار هایپرکلسترولمی با بذر شوید بهبود یافته بودند.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، بذر شوید اثرات مثبتی بربافت بیضه و پارامترهای اسپرم در موشهای هایپرکلسترولمی دارد.

واژگان کلیدی: بذر شوید، هایپرکلسترولمی، موش رت نر، پارامتر اسپرم

***نویسنده مسئول:** ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، گروه زیست شناسی

Email: f.farokhi@urmia.ac.ir

مقدمه

کلسترول یک ماده ی ضروری در تشکیل غشای سلول است و در بیوسنتز اسیدهای صفراوی و هورمون های استروئیدی و ویتامین D نقش بازی می کند، اما بالا بودن میزان آن در بدن می تواند همواره به عنوان یک فاکتور خطرناک باشد (۱). تری گلیسرید و کلسترول از گروه لیپید های بیو لوژیکی به حساب می آیند که مصرف بیش از اندازه ی آن‌ها از طریق غذا زمینه ی لازم را برای ابتلا فرد به هیپرتری گلیسریدمی و هایپرکلسترولمی ایجاد می کند (۲). بعضی مطالعات نشان دهنده ی اثر کلسترول در ایجاد کبد چرب هستند. به نظر می رسد که افزایش دریافت رژیمی کلسترول منجر به افزایش سنتز چربی در داخل کبد می شود. تجمع چربی در کبد حساسیت این بافت را نسبت به استرس اکسیداتیو افزایش می دهد و باعث پیشرفت استئاتوز و در نهایت سیروز کبد می شود (۲).

مقادیر سرمی تری گلیسرید با وزن بیضه همبستگی مثبت دارد. این احتمال می رود که افزایش سطح سرمی تری گلیسرید موجب افزایش تعداد رگ های خونی ، تعداد رگ-های لنفاوی و هم‌چنین افزایش توده ی بافت چربی در ساختار بافتی بیضه و در نتیجه افزایش وزن آن می گردد (۳) .

افزایش تجمع تری گلیسرید و کلسترول در بدن موجب افزایش وزن بدن می شود. در مردان چاق، بافت چربی در کیسه ی اسکروتوم انباشته می شود و اسپرماتوژنز و عملکرد سیستم تناسلی نر را تحت تأثیر قرار می دهد. چاقی، استرس اکسیداتیو را در سیستم تناسلی نر افزایش می دهد (۴). چندین دهه است که گونه های واکنشی اکسیژن به عنوان عامل مخرب و آسیب رسان به سلول ها و بافت‌ها شناخته شده است. مطالعات بسیاری نشان داده اند که ROS با بیماری هایی مانند سرطان، بیماری های قلبی-عروقی، نفروپاتی دیابتی و حتی با فرآیندهایی نظیر پیری و ناباروری نیز ارتباط دارد (۵).

از طرف دیگر، گولایا و همکاران اثبات کرده اند که یکی از دلایل ناباروری مردان تغییر اجزای فسفولیپیدی و ترکیب اسیدهای چرب غشا اسپرماتوزوئید می باشد (۵). لیپوپروتئین ها وظیفه‌ی جابه‌جایی چربی‌هایی از قبیل کلسترول را بین بافت ترشح کننده ی آن و اندام های هدف بر عهده دارند. جذب لیپید در ارگان هدف عمدتاً به واسطه ی لیپوپروتئینی صورت می گیرد. هم‌چنین لیپوپروتئین‌ها میزان عرضه استرول مورد نیاز برای انجام برخی از فعالیت‌های سلول از جمله شکل‌گیری غشاها و سنتز هورمون استروئیدی را تنظیم می کنند. محققین نشان دادند که سلول های لیدیگ بیضه موش صحرایی برای استروئیدوژنز عمدتاً کلسترول موجود در HDL-c را مورد استفاده قرار می دهند. مهم‌ترین استدلال هایی که در مورد به‌کارگیری HDL-c در مقایسه با سایر لیپوپروتئین سرم برای ساخت تستوسترون در بافت بیضه می توان در نظر گرفت، موارد ذیل است: الف) از نظر ساختار بیوشیمیایی ،HDL-c در بین بقیه ی لیپوپروتئین ها دارای بیشترین درصد فسفو لیپید و کمترین درصد تری گلیسرید است؛ ب) هیدرولیز HDL-c توسط لیپوپروتئین لیپاز سرمی منجر به تولید مقادیر فراوانی فسفولیپید می شود. فسفولیپید حاصله به راحتی از سدهای لیپیدی اکثر بافت ها از جمله بیضه عبور می نماید (۵) . هیپرتری گلیسریدمی موجب کاهش توانایی انجام واکنش آکروزومی در اسپرماتوزوئیدها می شود (۶). محققین گزارش کرده اند که افزایش سطح تری گلیسرید سرم موجب کاهش تحرک اسپرماتوزوئید در انسان می شود (۶) .

اسپرماتوزوآ به دلیل حضور آنزیم NADPH اکسیداز و زنجیره‌های اسید چرب غیر اشباع در غشای پلاسمایی و از دست دادن مقدار زیادی سیتوپلاسم به صورت قطرات سیتوپلاسمایی در طول فرایند تکامل (که باعث کاهش مقدار آنتی اکسیدان های داخل سلولی می شود)، نسبت به شرایط استرس اکسیداتیو آسیب پذیر است و بدین ترتیب اسپرماتوزوآ برای غلبه بر شرایط استرس اکسیداتیو به سیستم

های آنتی اکسیدانی خارج سلولی وابسته است. در واقع به علت این که میزان سیتوپلاسم اسپرم بالغ اندک است و غلظت آنزیم های از بین برنده ی ROS نیز در اسپرم کم می باشد، اسپرم بیش از هر سلول دیگری مستعد ایجاد استرس اکسیداتیو است و در ضمن به این علت که غشاء اسپرم حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیر اشباع می باشد، آسیب پذیری آن در برابر استرس اکسیداتیو زیاد است. به علاوه، به علت شکل خاص اسپرم، آنزیم های آنتی اکسیدان داخل سلولی نمی‌توانند غشاء پلاسمایی احاطه کننده ی آکروزوم و دم را حفاظت نمایند. اسپرم بخشی از دفاع آنتی اکسیدانی خود را مدیون مایع منی است. فشرده بودن DNA و حضور آنتی اکسیدان ها در مایع منی، DNA اسپرم را از آسیب اکسیداتیو محافظت می نماید. اما به هر حال آسیب به DNA اسپرمی که در معرض مقادیر زیاد ROS قرار داشته، مشاهده شده است. هم‌چنین، استرس اکسیداتیو سبب افزایش شکستگی در رشته های DNA می شود. شواهد محکمی وجود دارد که قطعه قطعه شدن DNA که به طور شایع در اسپرماتوزوآی افراد نابارور مشاهده می شود، به خاطر غلظت بالای ROS ایجاد می شود(۷).افزایش تشکیل ROS با کاهش تحرک اسپرم همراه است. این احتمال وجود دارد که افزایش تولید ROSدر نهایت سبب کاهش فسفوریلاسیون پروتئین های آکسونمی و عدم تحرک اسپرم شود (۸). اسپرم حساسیت زیادی نسبت به مقادیر بالای انواع اکسیژن فعال ROS دارد، زیرا غشای پلاسمایی آن دارای مقدار زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده است؛ در حالی‌که سیتوپلاسم آن مقدار کمی آنزیم های آنتی اکسیدانی دارد. در این صورت غشای پلاسمایی اسپرم آسیب دیده و فروپاشیDNA در هسته و ژنوم میتوکندری رخ می دهد. مطالعات نشان داده اند که اسپرماتوزوآ توسط آنتی اکسیدان های مختلف و آنزیم های آنتی اکسیدان موجود در مایع منی ویا خود اسپرماتوزوا در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می شوند. آنتی اکسیدان ها نقش گسترده ای در آندرولوژی بازی می کنند. این ترکیبات باعث محافظت اسپرماتوزوا در برابرROS تولید شده توسط اسپرماتوزوای غیر طبیعی، خنثی کردن ROS تولید شده توسط لکوسیت ها، ممانعت از قطعه قطعه شدن DNA، بهبود کیفیت مایع منی در افراد سیگاری ، کاهش آسیب سرما به اسپرماتوزوآ، ممانعت از بلوغ اسپرم نابالغ و افزایش حرکت اسپرماتوزوا می شوند. آنتی اکسیدان ها موادی هستند که واکنش زنجیره ای اکسیداتیو را می شکنند و بدین وسیله استرس اکسیداتیو را کاهش می دهند (۹). وجود گیاهان دارویی فراوان با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی مانند بذر شوید راهکار مناسبی در جهت پیش‌گیری و درمان بیماری کبدچرب به حساب می آید و در طب سنتی استفاده می شود. بذر شوید میزان قند خون را کاهش می دهد و به علت داشتن خواص آنتی اکسیدانی می تواند همزمان با کاهش قند خون میزان تری گلیسرید و کلسترول خون را پایین بیاورد (۱۰). عنصر فلاونوئید، کومارین، کوئرستین و فیتواسترول در انواع عصاره های شوید گزارش شده است که دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند(۱۱). عصاره ی بذر شوید به دلیل اثرات آنتی اکسیدانی خود باعث پاکسازی رادیکال های آزاد ناشی از لیپیدوز وهیپرکلسترولمی شده و در نتیجه میزان پراکسیداسیون فسفولیپید غشایی اسپرماتوزوآ کاهش یافته که این خود منجر به کاهش پراکسیدهای لیپیدی (MDA) می شود(۱۲).

مطالعات نشان داده است که عصاره ی الکلی بذر شوید به دلیل داشتن ترکیباتی چون فیتواسترول ها از طریق افزایش فعالیت لیپازهای کبدی و لیپو پروتئین ها و کاهش فعالیت آنزیم ۳هیدروکسی ۳متیل گلوتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز باعث کاهش کلسترول تام، کلسترولLDL و تری گلیسریدها می شود(۱۳). در مطالعه گرکو و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داده شد که آنتی اکسیدان ها قطعه قطعه شدن DNA اسپرم را در اثر استرس اکسیداتیو کاهش داده و در نتیجه فرآیند اسپرماتوژنز و بلوغ اسپرم به طور کامل انجام می شود. استرول‌های گیاهی باعث مهار فعالیت آنزیم سیتوکروم

p450 scc از طریق تغییر جایگاه فعال این آنزیم می شوند؛ در نتیجه، مانع انجام واکنش اکسیداسیون – احیا مابین NADPH و +NAP با گونه های فعال اکسیژن می شوند.از این رو،گونه های فعال اکسیژن موجب تخریب DNA اسپرم و فرآیند اسپرمیوژنز شده و تولید رده های سلولی اسپرماتوژنز کاهش یافته و قطر لوله سمنی فر کاهش می یابد و از این طریق سبب آتروفی لوله اسپرم ساز می شوند. مکانیسم اثر شوید در کاهش لیپیدهای سرم، احتمالاً شامل وقفه در جذب لیپیدها در دستگاه گوارش و کاهش سنتز کلسترول از نوع LDL-c می باشد؛ ضمن این که به عنوان یک مهرکننده برای برخی آنزیم‌هایی که در سنتز کلسترول نقش دارند نظیر هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز عمل می کند (۱۳).

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده و برای انجام آن از ۳۰ رت نر بالغ با میانگین وزنی ۲±۱۱۰گرم که از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود، استفاده گردید. حیوانات در طول مطالعه دسترسی کافی به آب و غذا به صورت یکسان داشتند. هم‌چنین سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای آن‌ها تأمین شد. رت‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه ۶ تایی تقسیم شدند؛ ۱- گروه کنترل سالم، ۲-گروه هایپرکلسترولمی(در این گروه به هر رت ۱/. میلی لیتر از ترکیب روغن بادام شیرین و کلسترول، روزانه تا ۳۰ روز به صورت خوراکی از طریق گاواژ خورانده شد)، ۳-گروه هایپرکلسترولمی تیمار شده با روزانه ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره بذر شوید (این گروه علاوه بر ۰/۱ میلی لیتر از ترکیب روغن بادام شیرین و کلسترول، با ۱ میلی لیتر روزانه ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره ی هیدروالکلی بذر شوید به مدت ۴۵ روز تیمار شدند)، ۴- گروه هایپرکلسترولمی تیمار شده با روزانه ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره بذر شوید (این گروه علاوه بر ۰/۱ میلی لیتر از ترکیب روغن بادام شیرین و کلسترول، با ۱ میلی لیتر روزانه ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره ی هیدروالکلی بذر شوید به مدت ۴۵ روز تیمار شدند) ۵- گروه سالم تیمار شده با روزانه ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره ی بذر شوید (این گروه با ۱ میلی لیتر عصاره ی هیدروالکلی روزانه ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بذر شوید به مدت ۴۵ روز تیمار شدند). موش‌های متعلق به گروه‌های آزمایش وکنترل پس از دوره زمانی ذکر شده به وسیله کلروفرم بیهوش وآسان‌کشی شدند. پوست ناحیه شکمی توسط اتانول ۷۰ درصد استریل شده وسپس در ناحیه شکم برشی ایجاد نموده و با جدا کردن بیضه‌ها از بدن به محلول ثباتی فرمالین ۱۰ درصد منتقل شدند.

بعد از آسان کشی حیوان، دم اپیدیدیم را از بیضه جدا نموده و در داخل پتری دیش ۳ سانتی متری که حاوی ۱ میلی لیتر HAMS F10 که قبلا برای ایجاد تعادل در داخل انکوباتور قرار داده شده بود، منتقل گشتند. برای خروج اسپرم‌ها اپیدیدیم به چند قطعه تقسیم شد. سپس پتری دیش همراه با محتویات داخلی به مدت ۳۰ دقیقه درانکوباتور قرار داده شد.

اندازه گیری وزن بدن

اندازه گیری وزن بدن هر یک از موش های مورد مطالعه با ترازوی دیجیتالی در ۲ نوبت در هفته ی قبل از آزمایش و هفتم انجام گرفت.

اندازه گیری وزن بیضه

در پایان مدت آزمایش، بعد از اطمینان از بیهوش بودن بدن حیوانات، قسمت تحتانی شکم حیوانات توسط برش جراحی شکافته شد وبیضه ها از بدن خارج شدند و با ترازوی دیجیتالی مدل A&D ساخت کشور کره توزین شدند.

اندکس بیضه

حیوانات قبل از شروع و بعد از پایان درمان وزن شدند. ۶ هفته پس از پایان درمان تمام حیوانات به وسیله کلروفرم بیهوش شده و هر دو بیضه از بدن خارج و وزن

گردیدند. سپس اندکس وزن بیضه به وسیله ی فرمول زیر محاسبه گردید (۱۴):

$$\text{اندکس بیضه} = \frac{\text{وزن بیضه}}{\text{وزن حیوان}} \times ۱۰۰$$

تهیه ی اسپرم

بعد از جراحی، دم اپیدیدیم چپ از سایر قسمت ها جدا شده و داخل محیط کشت HAMS F10 انتقال داده شد. بافت اپیدیدیم را در پتری دیش حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت HTF توسط قیچی به قطعات کوچک خرد کرده و بعد از به هم زدن لوله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO_2 ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از ۳۰ دقیقه اسپرم ها خارج و در محیط پخش شدند. سپس لوله ها را به هم زده و رقت ۱:۱۰۰ از سوسپانسیون تهیه و اسپرم ها را از نظر تعداد، درصد تحرک و درصد قابلیت زیست مورد بررسی قرار گرفت.آنالیز اسپرم ها بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت(۱۵).

شمارش اسپرم

جهت شمارش اسپرم از لام نئوبار استفاده شد. بدین صورت که یک قطره از محلول روی لام ریخته شد و لامل سنگی از قبل بر روی آن قرار داده شد و اسپرم ها در زیر میکروسکوپ شمارش گردیدند جهت اطمینان و کاهش احتمال خطا هر چهار بخش (قسمت۱۶خانه ای) موجود در روی لام نئوبار شمارش شد. سپس میانگین آن‌ها محاسبه گردید و عدد حاصل در عدد۱۰۶ ضرب گردید تا به عنوان تعداد کل اسپرم منظور شود (۱۵).

درصد تحرک اسپرم

۱۰میکرولیتر از محلول رقیق شده حاوی اسپرم را روی لام قرار داده و آنگاه اسپرم ها را از لحاظ درصد تحرک بررسی شدندبرای به دست آوردن درصد تحرک۱۰ میدان میکروسکوپ با بزرگنمایی×۱۰۰۰ روی لام بررسی شد وسپس میانگین کل اسپرم های متحرک در ۱۰ میدان دید میکروسکوپ به عنوان درصد تحرک بیان شد (۱۵).

بررسی پارامترهای مربوط به اسپرم به وسیله رنگ آمیزی‌های اختصاصی

رنگ آمیزی آنیلین بلو

به منظور ارزیابی بلوغ هسته اسپرم از این رنگ آمیزی استفاده شد. طی مرحله اسپرمیوژنز، پروتامین به جای هیستون در کروماتین هسته قرار می گیرد که این جایگزینی برای پایداری و تراکم اسپرم بسیار مهم است. اسپرم های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی تیره مایل به خاکستری دیده می شوند، ولی این اسپرم ها به دلیل حضور پروتامین در اسپرم های بالغ، در رنگ آمیزی آنیلین بلو رنگ پذیری کم تری دارند (لام ها در محلول اتانول- استون تثبیت و بعد در مجاورت هوا قرار گرفته، لام ها به مدت ۷دقیقه در محلول حاوی رنگ آنیلین بلو قرار گرفته و پس از خشک شدن در معرض هوا به کمک میکروسکوپ نوری و درشت نمایی (۱۰۰۰×) بررسی شدند)(۱۶).

رنگ آمیزی آکردین اورنج- فلورسنت

برای بررسی میزان آسیب DNA اسپرم از رنگ آمیزی آکردین اورنج- فلورسنت به روش Tejada and Mitchel استفاده شد. این رنگ فلورسنت، جهت تمایز DNA دو رشته ای سالم از DNA تک رشته ای ناسالم و دناتوره به کار می رود. DNA دو رشته ای سالم زیر میکروسکوپ فلورسنت، سبز رنگ و DNA تک رشته ای دناتوره زرد تا قرمز رنگ دیده می شود. پس از تهیه اسمیر از هر نمونه و خشک شدن آن ها ، پروسه ی فیکس کردن توسط محلول اتانول- استون انجام گرفت. در مرحله بعد نمونه‌ها در محلول سولفات آهن به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس با مقدار کمی آب مقطر شستشو و بعد به مدت ۱۱ دقیقه، توسط رنگ آکردین اورنج رنگ آمیزی شدند. بعد از شستشو با آب جاری، برای بررسی با میکروسکوپ فلورسانت اسپری فلورسانت روی نمونه زده شد. میکروسکوپ فلورسنت با فیلتر ۴۶۰ نانومتر، برای بررسی لام های تهیه شده تنظیم و مشاهده گردید(۱۶).

رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین

برای ارزیابی درصد اسپرم های زنده و هم چنین تشخیص اسپرم های زنده از مرده، از روش رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین استفاده شد. بر اثر آسیب به غشای پلاسمایی، اسپرم ها در برابر رنگ نام برده نفوذ پذیر می شوند. در نتیجه اسپرم هایی که در نواحی سر، گردن و دم رنگ را به خود جذب کنند، به عنوان اسپرم های مرده اطلاق می شوند. نتایج برحسب درصد بیان شدند. روش کار به این صورت است که ۵۰ میکرولیتر از اسپرم روی لام ریخته و ۲۰ میکرولیتر ائوزین به آن اضافه شد، پس از ۵ ثانیه ۵۰ میکرولیتر نگروزین اضافه کرده و به طور کامل با یکدیگر مخلوط و سپس اسمیر تهیه شد. اسپرم های بی رنگ سالم و اسپرم های رنگی به عنوان مرده در نظر گرفته شدند (۱۵).

رنگ آمیزی هماتوکسیلین –ائوزین برای مطالعه ی مورفولوژی بافت بیضه

پیش از رنگ آمیزی لام ها در ظروف مختلف گزیلول به مدت سه دقیقه قرار داده شدند تا پارافین اضافی زدوده شود. در مرحله ی بعد، با استفاده از الکل اتیلیک با درجات صعودی ۷۰ ، ۸۰ و ۹۰ و دو ظرف الکل مطلق آب-گیری صورت گرفت. نمونه ها در هر ظرف به مدت ۳ دقیقه فرو برده شدند. سپس لام ها به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف هماتوکسیلین قرار داده شدند. سپس به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در آب جاری شست و شو انجام گرفت. به منظور زدودن رنگ اضافی و تمایز، لام ها به مدت ۳ تا ۵ ثانیه در محلول اسید الکل برده شدند. برای تهیه ی اسید الکل، ۹۹ میلی لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درجه با ۱ میلی لیتر اسیدکلریدریک غلیظ مخلوط می شود. سپس نمونه ها دوباره در آب جاری به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه شست و شو داده می شوند. برای ثابت کردن رنگ هسته ی سلول ها، نمونه ها به مدت ۱ دقیقه در ظرف حاوی کربنات لیتیوم قرار داده شدند و سپس در آب جاری شسته شدند. در مرحله ی بعد، نمونه های بافتی به مدت ۳ تا ۵ دقیقه در ظرف حاوی ائوزین قرار داده شدند. پس از رنگ آمیزی با ائوزین، به منظور آب‌گیری، سبد حاوی لام ها در ظروف حاوی الکل اتیلیک با درجات صعودی ۷۰ ، ۸۰ و ۹۰ و دو ظرف الکل مطلق هر کدام به مدت ۳ دقیقه قرار داده شدند و در قدم بعدی هر کدام از نمونه ها به مدت ۳ دقیقه در ظروف حاوی گزیلول قرار گرفتند.

در مرحله ی آخر، لام های رنگ آمیزی شده را از سبد خارج نموده و پس از تمیز نمودن اطراف نمونه ها، یک قطره چسب انتانول روی لام ها قرار داده و یک لامل را با زاویه ی ۴۵ درجه روی لام گذاشته و با فشار انگشت هوای بین لام و لامل خارج می گردد. پس از خشک شدن لام، نمونه ها آماده ی مطالعه شدند (۱۷).

قطر لومن لوله سمنی فر

ابتدا ۲ قطر عمود بر هم محاسبه و سپس میانگین اقطار محاسبه و بدین ترتیب قطر لومن لوله سمنی فر به دست می آید (۱۸)

ضخامت اپی تلیوم لوله های منی ساز

از اسپرماتوگونی های موجود در زیر دیواره لوله-های منی ساز یک طرف لوله تا جایی که اسپرماتید ها وجود داشت بر اساس میکرومتر با عدسی مدرج محاسبه شد که در نتیجه لوله های منی ساز با مقطع گرد یا نزدیک به گرد مورد بررسی فرار گرفت (۱۸).

ارزیابی اسپرماتوژنز در بافت بیضه

ضریب تمایز لوله ای (TDI) و ضریب اسپرمیوژنز (SPI) دو فاکتور مهم برای ارزیابی اسپرماتوژنز در لوله های منی ساز محسوب می گردند.

تعیین ضریب اسپرمیوژنز (SPI)

از ۲۰ لوله منی ساز به ازای هر مقطع به صورت تصادفی، در هر گروه آزمایشی که با عدسی شیئی ۴۰× مشاهده شد به منظور بررسی ضریب اسپرمیوژنز استفاده گردید و درصد لوله های منی سازی که در حال اسپرمیوژنز هستند به درصد لوله های فاقد این فرآیند ارزیابی گردید و نتایج به صورت درصد بیان شد(۱۹).

تعیین ضریب تمایز لوله ای TDI

بدین منظور، مقطع عرضی ۲۰ لوله منی ساز به ازای هر مقطع در گروه‌های مختلف آزمایشی، در بیضه انتخاب شد. درصد لوله های منی سازی که شامل ۴ یا بیش از چهار ردیف از سلول های تمایز یافته اسپرماتوگونی A می باشند، محاسبه و نتایج به صورت درصد اعلام شد(۱۹).

تهیه عصاره

برای تهیه عصاره، مقدار ۲۰۰ گرم بذر شوید تازه از فروشگاه محلی گیاهان دارویی خریداری شد و پس از بررسی و تأیید بذر شوید توسط گروه علوم گیاهی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه، حدود ۵۰ گرم از مواد اضافی توسط دستگاه آسیاب کن مکانیکی استخراج گردید و ۱۵۰ گرم بذر شوید یک دست تهیه شد و ۱۵۰ گرم پودر بذر شوید را همراه با الکل ۸۰ درصد در یک ارلن به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده و سپس مایع رویی را صاف نموده و محلول صاف شده را در داخل پتری دیش هایی که از قبل با الکل تمیز شده بودند، منتقل نموده و با قرار دادن در انکباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت عصاره عسلی در پتری دیش تهیه شد. این ظرف پس از پوشاندن با فویل آلومینیومی تا زمان گاواژ به یخچال انتقال داده شد.

تحلیل آماری

تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون های آماری آنووای یک طرفه و تست تعقیبی توکی انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین±انحراف استاندارد ارائه شده و$p <$ ۰/۰۵ به عنوان حداقل سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.

یافته ها

همان طور که در جدول ۱ دیده می شود، درصد بلوغ اسپرم در تمام گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است (p<۰/۰۵) . در حالی‌که درصد بلوغ اسپرم در تمام گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی افزایش معنی داری را نشان داد ($p <$ ۰/۰۵). هم‌چنین درصد آسیب DNA اسپرم در تمام گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است (p<۰/۰۵). درصد آسیب DNA اسپرم در موش های گروه کنترل و موش های هیپرکلسترولمی درمان شده با عصاره ی بذر شوید با دوز ۵۰۰ میلی گرم و موش های سالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید با دوز ۵۰۰ میلی گرم به طور معنی داری در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی کاهش یافته است (p<۰/۰۵).

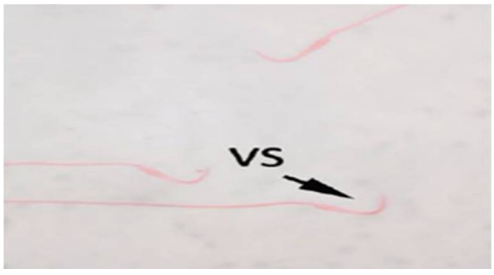
جدول۱. میانگین تغییرات پارامترهای اسپرمی در گروه های مختلف آزمایش

گروه های آزمایشی	کنترل سالم	هیپرکلسترولمی	هیپرکلسترولمی + عصاره ی ۳۰۰	هیپرکلسترولمی + عصاره ی ۵۰۰	سالم + عصاره ی ۵۰۰
تغییرات بلوغ اسپرم (درصد)	۵۰/۶۶ ± ۲/۴۹ #	۷/۷۳ ± ۰/۶۱*	۴۷ ± ۲/۶۵ #*	۴۳/۸۳±۳/۸۱ #*	۴۳±۳/۶۶ #*
آسیب DNA اسپرم (درصد)	۳۷ ± ۷/۱۸ #	۶۰/۱۶ ± ۱۰/۴۴ *	۵۷/۸۳ ± ۳/۲۰ *	۵۲/۸۳ ± ۳/۱۰ #*	۴۱/۸۳ ± ۴/۰۴ #*
میزان زنده مانی اسپرم (درصد)	۳۹ ± ۲/۹۸ #	۶/۱۲ ± ۱/۴۸ *	۱۵/۵۸ ± ۲/۸۱ # *	۲۷/۶۶ ± ۲/۹۴ #*	۲۹ ± ۳/۰۷ #*
تحرک اسپرم (درصد)	۶۶/۴۹ ± ۶/۵۶ #	۳۰/۸۱ ± ۷/۵۹*	۳۷/۲۹ ± ۵/۳۷*	۴۳/۶۲ ± ۴/۳۶*	۴۵/۱۰ ± ۲/۱۵ #*
تعداد اسپرم 10^6 ×	۲۹/۳۹ ± ۲۳/۵۲ #	۲۴/۶ ± ۴/۱۸*	۴۲/۱۶ ± ۲/۹ #*	۵۹/۵۴ ± ۸/۰۸ #*	۱۵/۳۵± ۱۷/۵۸ #*

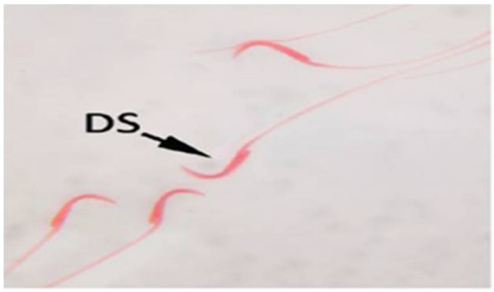
مقادیر به صورت میانگین±انحراف استاندارد برای۶ سر موش نر در هر گروه ارائه شده است.*اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم($p <$ ۰/۰۵) #اختلاف معنی دار با گروه هیپرکلسترولمی($p <$ ۰/۰۵).

درصد آسیب DNA اسپرم در گروه هیپرکلسترولمی درمان شده با عصاره ی بذر شوید با دوز ۳۰۰ میلی‌گرم در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی اختلاف معنی داری را نشان نداد($p <$ ۰/۰۵).

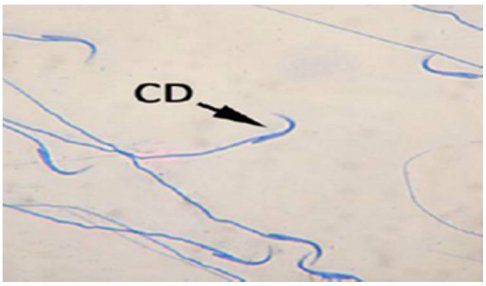
درصد زنده مانی اسپرم در تمام گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$). درحالی‌که درصد زنده مانی اسپرم در تمام گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۵$). درصد تحرک اسپرم در تمام گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$). در حالی‌که درصد تحرک اسپرم در گروه کنترل و موش های سالم تیمار شده با عصاره‌ی بذر شوید با دوز ۵۰۰ میلی گرم در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۵$). هم‌چنین تعداد اسپرم در تمام گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$). در حالی‌که تعداد اسپرم در تمام گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۵$)(تصاویر ۱ تا ۴) .



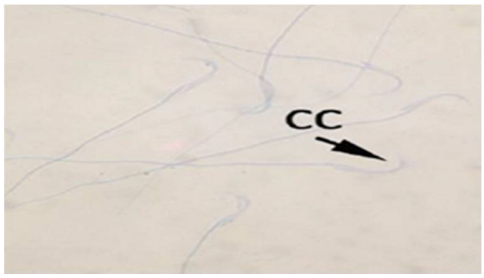
تصویر ۱. اسپرم زنده با سر صورتی روشن
VS: viable sperm
رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین درشت‌نمایی×۱۰۰۰



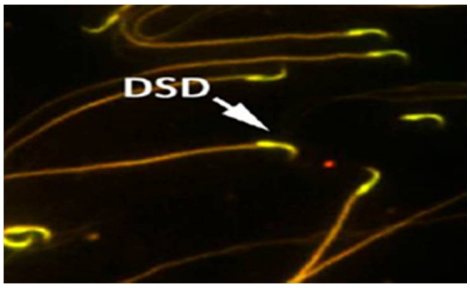
تصویر۲. اسپرم مرده با سر تیره
DS: death sperm
رنگ آمیزی ائوزین-نگروزین درشت‌نمایی×۱۰۰۰



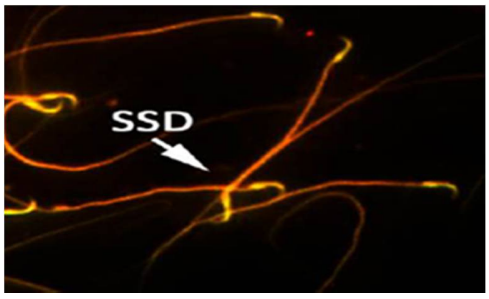
تصویر۳. اسپرم بالغ با سر آبی پررنگ
CD: chromatin decondensation
رنگ آمیزی آنیلین-بلو درشتنمایی×۱۰۰۰



تصویر٤.اسپرم نابالغ با سر آبی روشن
CC: condenswd chromatin
رنگ آمیزی آنیلین-بلو درشتنمایی×۱۰۰۰



تصویر۵. اسپرم باDNA سالم وسر سبز رنگ
DSD: double strand DNA
رنگ آمیزی اکریدین-اورنج درشت‌نمایی×۱۰۰۰



تصویر٦. اسپرم با DNAآسیب دیده و سرنارنجی رنگ
SSD: single strand DNA
رنگ آمیزی آکریدین-اورنج درشت‌نمایی×۱۰۰۰

همان‌طور که در جدول ۲ دیده می شود، میانگین ضریب تمایز لوله ای در تمام گروه های آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافته است($p < ۰/۰۵$). در حالی‌که ضریب تمایز لوله ای در تمام گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی داری افزایش یافته است($p < ۰/۰۵$). ضریب اسپرمیوژنز در تمام گروه‌های آزمایشی به جز هیپرکلسترولمی تیمار شده با عصاره۵۰۰ در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است($p < ۰/۰۵$)). در حالی‌که ضریب اسپرمیوژنز در تمام گروه ها در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی داری افزایش یافته است($p < ۰/۰۵$). ضخامت اپی تلیوم در گروه هیپرکلسترولمی و موش های هیپرکلسترولمی درمان شده با عصاره ی بذر شوید با دوزهای ۵۰۰ میلی گرم و ۳۰۰ میلی-گرم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$). البته ضخامت اپی تلیوم در موش های سالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید با دوز ۵۰۰ میلی گرم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری را نشان نداد($۰/۰۵ > p$). ضخامت اپی تلیوم در تمام گروه های آزمایش در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی داری افزایش یافته است($p < ۰/۰۵$). قطر لومن لوله ی سمنیفر در تمام گروه ها در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است($p < ۰/۰۵$). در حالیکه قطر لومن لوله ی سمنیفر در تمام گروه ها در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$). میانگین وزن بیضه در گروه هیپرکلسترولمی و موش های هیپرکلسترولمی درمان شده با عصاره ی بذر شوید با دوز های ۳۰۰ میلی گرم و ۵۰۰ میلی گرم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته است ($p < ۰/۰۵$). وزن بیضه در موش های سالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید با دوز ۵۰۰ میلی گرم در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافته است($۰/۰۵ > p$). میانگین وزن بیضه در تمام گروه های آزمایش در مقایسه با گروه هیپرکلسترولمی به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($p < ۰/۰۵$). درصد اندکس بیضه در گروه هیپرکلسترولمی در مان شده با عصاره ی بذر شوید با دوز های ۳۰۰ میلی گرم و ۵۰۰ میلی گرم و موش های سالم تیمار شده با عصاره‌ی بذر شوید با دوز ۵۰۰ میلی گرم در مقایسه با گروه کنترل و هیپرکلسترولمی به طور معنی داری کاهش یافته است($۰/۰۵ > p$).

جدول۲. نتایج حاصل از بررسی پارامتر های استریولوژیک بافت بیضه در گروه‌های مختلف آزمایش

گروه های آزمایشی	کنترل سالم	هیپرکلسترولمی	هیپرکلسترولمی + عصاره ی ۳۰۰	هیپرکلسترولمی + عصاره ی ۵۰۰	سالم + عصاره ی ۵۰۰
ضریب تمایز لوله ای (درصد)	۹۲/۳۳ ± ۱/۰۵ #	۳۶/۶۶ ± ۱/۷۴ *	۷۷/۵ ± ۴/۴۷ #*	۸۴/۱۶ ± ۸/۸۱ #*	۶۱/۱۶ ± ۵/۹۰ #*
ضریب اسپرمیوژنز (درصد)	۶۶/۳۳ ± ۹/۷۶ #	۱۶/۵ ± ۱/۲۵ *	۵۲ ± ۲/۴۴ #*	۶۴/۵ ± ۴/۵۱ #	۳۹/۶۶ ± ۵/۶۰ #*
ضخامت اپیتلیوم (میکرون)	۹/۸۸ ± ۰/۷۷ #	۵/۷ ± ۰/۹۹ *	۶/۹۵ ± ۰/۸۷ #*	۷/۶۷ ± ۰/۵۲ #*	۸/۶۶ ± ۰/۸۸ #
قطر لومن لوله سمنیفر(میکرون)	۳۳/۹۳ ± ۰/۹۳ #	۴۸/۲۸ ± ۱/۸۱ *	۳۹/۶۹ ± ۱/۱۹ #*	۳۷/۲۸ ± ۱/۳۰ #*	۳۵/۶۱ ± ۱/۳۳ #*
وزن بیضه (گرم)	۳/۴۹ ± ۰/۷۱ #	۸/۰۵ ± ۱/۰۲ *	۵/۹۳ ± ۰/۶۸ #*	۵/۹۳ ± ۰/۹۶ #*	۲/۵ ± ۰/۵۷ #*
اندکس بیضه (درصد)	۳/۴ ± ۰/۰۰۷	۴/۶ ± ۰/۰۰۹	۳/۶ ± ۰/۰۰۵ #*	۲/۱ ± ۰/۰۰۴ #*	۲ ± ۰/۰۰۵ #*

مقادیر به صورت میانگین±انحراف استاندارد برای۶ سر موش نر در هر گروه ارائه شده است.*اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم($۰/۰۵ > p$)#اختلاف معنی دار با گروه هیپرکلسترولمی($p < ۰/۰۵$).

مطالعه میکروسکوپی مقاطع بافتی لوله های سمنیفر درموش های نر هایپرکلسترولمی شده

در مطالعات ریزبینی در لوله های سمنی فر گروه کنترل سالم تمامی سلول های رده ی اسپرماتوزنز در داخل لوله ها به صورت منسجم مشاهده شدند(تصویر ۷).در گروه هایپرکلسترولمی، برخی از سلول های رده ی اسپرماتوژنز در لوله وجود نداشت و ارتباطات بین سلولی سلول های رده ی اسپرماتوژنز دچار آسیب شده وتخریب قسمت زیادی از لوله

های سمنی فر و واکوئله شدن در اپیتلیوم اصلی لوله های سمنی فر و آزواسپرمی در لوله ها مشاهده شد (تصویر ۸). در گروه های هایپرکلسترولمی درمان شده با عصاره ی بذرشوید با دوزهای متفاوت وگروه سالم تیمار شده با عصاره ی بذرشوید با دوز بالا، از لحاظ ساختاری، رده های سلولی وضعیت طبیعی داشته و به طور منظم در کنار همدیگر قرار داشتند و هیچ‌گونه آسیبی در اتصال ما بین سلول ها و سایر بخش های بیضه و لوله های سمنی فر مشاهده نشد (تصاویر ۱۱-۹).

تصویر ۷ تصویر ۸ تصویر ۹ تصویر ۱۰ تصویر ۱۱

بحث

افزایش سطح تری گلیسرید موجب افزایش تعداد رگ های خونی، تعداد رگ های لنفاوی و هم‌چنین افزایش توده بافت چربی در ساختار بافتی بیضه و در نتیجه افزایش وزن آن می شود(۱۳). در تحقیق حاضر، افزایش معنی دار وزن بیضه در موش های هیپرکلسترولمی دیده شد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد وزن بیضه در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی-داری پیدا کرده است. به نظر می رسد کاهش وزن بیضه ها مربوط به اثرات گیاه شوید در کاهش میزان کلسترول و تری گلیسرید باشد. مطالعات نشان داده است که عصاره ی الکلی بذر شوید به دلیل داشتن ترکیباتی چون فیتواسترول ها از طریق افزایش فعالیت لیپازهای کبدی و لیپو پروتئین ها و کاهش فعالیت آنزیم ۳هیدروکسی ۳متیل گلوتاریل کوآنزیم آ ردوکتاز باعث کاهش کلسترول تام، کلسترولLDL و تری گلیسریدها می شود که منجر به کاهش وزن بدن و وزن بیضه ها می‌گردد(۱۳). از طرفی، آتروفی لوله های اسپرم ساز نیز می تواند یکی دیگر از دلایل کاهش وزن بیضه باشد. علاوه بر آن می توان احتمال داد که کاهش وزن بیضه مربوط به اثرات آنتی آندروژنی کومارین ها و فیتواسترول ها باشد که باعث کاهش تستوسترون می شوند. کاهش تستوسترون از طریق کاهش سنتز پروتئین ها و افزایش هورمونT3 و لیپولیز و پروتئولیز باعث کاهش وزن بیضه ها می شود. در مطالعات انجام شده توسط مالینی و همکاران مشخص شده است که

فیتواسترول ها سبب کاهش وزن بیضه ها و کاهش ذخیره اسپرم در اپیدیدیم می گردند(۲۰). در تحقیق حاضر نیز کاهش معنی داری در وزن موش های هیپرکلسترولمی و سالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید مشاهده شد. در حالت هایپرکلسترولمی و استرس اکسیداتیو و تولید گونه های فعال اکسیژن، کاهش تعداد لایه های اپی تلیوم منی ساز را می توان در نتیجه توقف تقسیمات میتوزی اسپرماتوگونیومB نیز دانست که به معنی طویل شدن فاز G1 است. طولانی شدن فاز G1 در نتیجه ممانعت از سنتز سیکلین، به خاطر بیان بیش از اندازه ی ژن XBP1 است. این پروموتور ژن دارای چندین عامل تنظیم شونده با استرس است که یکی از آن‌ها به استرس اکسیداتیو پاسخ می دهد(۲۰). در تحقیق حاضر نیز در موش های هیپرکلسترولمی ضخامت اپی تلیوم منی ساز کاهش یافت. افزایش قطر لومن لوله منی ساز با کاهش تجمع اسپرم مرتبط است، علاوه بر آن افزایش قطر لومن لوله منی ساز ممکن است به دلیل کاهش سطح گنادوتروپین ها به خصوص تستوسترون باشد (۲۰). در تحقیق حاضر نیز در موش های هیپرکلسترولمی قطر لومن لوله منی ساز افزایش یافت. در حالت هیپرکلسترولمی کاهش قطر لوله های منی ساز ممکن است به دلیل کاهش تعداد سلول های سرتولی و جنسی در اثر آپوپتوزیس یا اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز باشد (۲۱).

استرول های گیاهی باعث مهار فعالیت آنزیم سیتوکروم p450 scc از طریق تغییر جایگاه فعال این آنزیم می شوند؛ در نتیجه، مانع انجام واکنش اکسیداسیون – احیا مابین NADPH و +NAP با گونه های فعال اکسیژن می شوند. از این رو،گونه های فعال اکسیژن موجب تخریب DNA اسپرم و فرآیند اسپرمیوژنز شده، تولید رده های سلولی اسپرماتوژنز کاهش یافته ، قطر لوله سمنی فر کاهش می یابد و از این طریق سبب آتروفی لوله اسپرم ساز می شوند (۲۱). بنابراین کاهش قطر لوله های اسپرم ساز در گروه های دریافت کننده عصاره بذر شوید نیز می تواند به وجود بتاسیتوسترول در این عصاره مربوط باشد(۲۱). فیتواسترول‌ها و کومارین موجود در عصاره ی بذر شوید دارای اثرات استروژنیک هستند و در جنس نر سبب گسستگی فرآیند اسپرماتوژنز و افزایش قطر لومن می شوند (۲۱). در تحقیق حاضر در موش های هیپرکلسترولمی و سالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید، قطر لومن افزایش یافت.

بر اساس گزارشات موجود، فلاونوئید ها با اثر بر DNA سلولی می توانند همانندسازی DNA را مهار کرده و مانع تکثیر سلول ها و تحریک روند آپوپتوز سلولی شوند و در نتیجه موجب کاهش سلول های اسپرماتوژنیک و کاهش ضخامت اپی تلیوم منی ساز می شوند (۲۲) در تحقیق حاضر، در موش های هیپرکلسترولمی وسالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید، ضخامت اپی تلیوم منی ساز کاهش یافت. اسپرماتوژنز فرآیندی سازمان یافته از تمایز و بلوغ سلول های زایا در بیضه است. در طول اسپرمیوژنز، هسته اسپرماتید با جایگزین شدن هیستون های هسته ای توسط پروتئین های انتقالی و سپس پروتامین ها تغییر شکل می یابد و متراکم می شود(۲۲) تراکم هسته برای حفاظت ژنوم اسپرم از استرس های خارجی، نظیر استرس های اکسیداتیو لازم به نظر می رسد(۲۲) بازهای DNA اسپرم و پیوندهای فسفودی استر ساختار آن به صدمات پراکسیداتیو حساس هستند، به طوری که سطح بالای ROS منجر به تخریب بازها و پیوستگی عرضی پروتئین ها و تجزیه شدن DNA می شود(۲۳). تولید بیش از حد ROS باعث قطعه قطعه شدن DNA می شود و این تخریب از طریق تغییر در بازهای آلی، شکستن پیوند های عرضی بین۲رشته DNA یا شکستگی در یک رشته DNA، حذف یا آرایش مجدد کروموزومی رخ می دهد(۲۳). مولکول های MDA با نفوذ به درون ساختار غشا سلول موجب عدم تقارن در توزیع اجزاء لیپیدی غشا می شود. علاوه بر این با ایجاد پیوند های محکم با DNA سلول موجب بروز صدمات و شکستگی در کروموزوم می شود (۲۴). در تحقیق حاضر نیز در گروه هیپرکلسترولمی تخریب DNA اسپرم اتفاق افتاد.

یکی از ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در بذر شوید کوئرستین می باشد. کوئرستین دارای اثرات محافظتی بر سلول های اسپرماتوگونی تحت استرس اکسیداتیو است و با دادن الکترون به گونه های اکسیژن فعال (ROS) تخریب DNA سلولی را کاهش می دهد (۲۵). در تحقیق حاضر نیز بذر شوید موجب کاهش آسیب DNA اسپرم شد. در حالت هایپرکلسترولمی و استرس اکسیداتیو ناشی از آن و در پی آن پراکسیداسیون لیپید منجر به آزاد شدن فاکتورهای آپوپتوژنیک مثل سیتوکروم c و فاکتورهای القا کننده ی آپاپتوزیس(Apoptosis inducing factor) از میتوکندری ها می شود. هم‌چنین این آلاینده ها ممکن است با ایجاد اختلال در عملکرد میتوکندری ها موجب اختلال در فرآیند فسفوریلاسیون اکسیداتیو این اندامک شده و منجر به تخلیه ATP در اسپرم شود و در نهایت منجر به کاهش قابلیت حیات در اسپرم گردد(۲۶). در تحقیق حاضر نیز قابلیت حیات اسپرم در موش های هیپرکلسترولمی کاهش یافت.

مطالعه در ترکیب شیمیایی بذر شوید حضور فلاونوئید ها،کوئرستین،کومارین وفیتواسترول ها را نشان می دهد.فلاونوئید ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضدسرطانی وضد ویروسی هستند. این ترکیبات از طریق مهار تشکیل ROS، حذف ROS وحفاظت از سیستم دفاع آنتی اکسیدانی با استرس اکسیداتیو مقابله می کنند و کاهش تولید ROS باعث کاهش نفوذپذیری سلولی و افزایش حیات اسپرم می شود (۲۶). در تحقیق حاضر نیز عصاره ی بذر شوید موجب افزایش حیات اسپرم در موش های هیپرکلسترولمی تیمار شده با عصاره ی بذر شوید شد.

مطالعات کوباشی و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان داد که یک کاهش مستمر در تعداد سلول های اسپرم زنده و فعال در ارتباط با افزایش مقدار ROS وجود دارد (۲۶)، چون باعث افزایش مقدار آنزیم MDA و در نتیجه اختلال در نظم و فعالیت غشا سلولی می شود، به طوری که روند انتقال یونی و گرادیان غلظتی یون ها در دو طرف غشا و هم‌چنین انتقال پیامبرهای شیمیایی نیز مختل می گردد (۲۴). با توجه به افزایش استرس اکسیداتیو و در پی آن افزایش آنزیم MDA که فرآورده ی نهایی پراکسیداسیون لیپیدی توسط گونه های فعال ROS است می توان به این نتیجه رسید که تولید ROS باعث توقف سیکل سلولی و افزایش فرآیند آپوپتوز می شود که بدین ترتیب باعث کاهش تولید روزانه اسپرم و هم‌چنین کاهش تعداد کلی اسپرم می‌گردد(۲۷). در تحقیق حاضر نیز در موش های هیپرکلسترولمی تعداد اسپرم کاهش یافت.

ترکیبات آنتی اکسیدانی چون فلاونوئیدها از طریق کاهش آسیب های ایجاد شده توسط رادیکال های آزاد، تقویت و استحکام سد خونی – بیضه ای و حفاظت و ترمیم DNA اسپرم ها موجب بهبود اسپرماتوژنز و افزایش تعداد اسپرم می شود (۲۷). در تحقیق حاضر تعداد اسپرم در موش های هیپرکلسترولمی تیمار شده با عصاره ی بذر شوید افزایش یاف.

بر اساس گزارشات موجود، فلاونوئید ها با اثر بر DNA سلولی می توانند همانندسازی DNA را مهار کرده و مانع تکثیر سلول ها و تحریک روند آپوپتوز سلولی شوند و در نتیجه موجب کاهش سلول های اسپرماتوژنیک و کاهش تعداد اسپرم می شوند (۲۸) در تحقیق حاضر تعداد اسپرم در موش های سالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید کاهش یافت.

کلسترول یک ماده ی ضروری در تشکیل غشای سلول است و در بیوسنتز اسیدهای صفراوی و هورمون های استروئیدی و ویتامین D نقش بازی می کند. اما بالا بودن میزان آن در بدن می تواند همواره به عنوان یک فاکتور خطرناک باشد (۲۹). افزایش غلظت کلسترول سلولی رونویسی ژن کد کننده ی گیرنده LDL را کاهش می دهد. ضمن این‌که جیره ی غذایی نقش مهمی در تنظیم کلسترول خون دارد. به عنوان مثال، جذب بیش از حد انرژی، تولید VLDL را در کبد افزایش می دهد که به عنوان پیش ساز

LDL-c در گردش خون عمل می نماید، در حالی‌که چربی و کلسترول جیره ی غذایی به ویژه چربی های اشباع شده، موجب بالا رفتن کلسترول خون می شوند (۲۹).

اختلال در متابولیسم لیپید سبب افزایش اسیدچرب آزاد در خون و افزایش بافت چربی می شود. لیپولیز در بافت چربی در طی بیماری سبب افزایش اسیدچرب آزاد در گردش خون می گردد و سپس اسید های چرب آزاد که برای ساختار و عملکرد هر سلول در بدن مورد نیاز هستند و یک جزء مهم از غشا سلولی را تشکیل می دهند، وارد کبد شده و به شکل تری گلیسرید ذخیره می شوند (۲۹). کلسترول، استرول اصلی موجود در بافت های حیوانی و از لیپیدهای ساختمانی است که در غشای سلول های یوکاریوتی یافت می شود. افزایش کلسترول، احتمالاً به دلیل افزایش در بیوسنتز کلسترول یا به دلیل کاهش کلیرنس آن از خون می باشد (۲۹) افزایش سنتز کلسترول نتیجه افزایش فعالیت آنزیم HMG-coA ردوکتاز می‌باشد. در تحقیق حاضر، میزان کلسترول در موش‌های هیپرکلسترولمی افزایش یافت. استرول‌های گیاهی مانع جذب کلسترول غذایی می شوند و فیبرهای محلول سبب کاهش کلسترول وLDL سرم می‌گردند مکانیسم عمل به این صورت است که فیبرهای محلول به طور وابسته به دوز، سطح سرمی کلسترول تام وLDL را کاهش می دهند. فیبرهای غذایی می توانند با افزایش سنتز اسیدهای صفراوی و افزایش دفع آن در مدفوع و کاهش جذب روده ای کلسترول اثر کاهندگی کلسترول را داشته باشند (۲۹). مکانیسم اثر شوید در کاهش لیپیدهای سرم، احتمالاً شامل وقفه در جذب لیپیدها در دستگاه گوارش و کاهش سنتز کلسترول از نوع LDL-c گزارش شده است. ضمن این‌که یک مهرکننده برای برخی آنزیم هایی که در سنتز کلسترول نقش دارند نظیر هیدروکسی متیل گلوتاریل کوآنزیم A ردوکتاز عمل می کند (۳۰). در تحقیق حاضر میزان کلسترول در موش های هیپرکلسترولمی و سالم تیمار شده با عصاره ی بذر شوید کاهش یافت.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق عصاره ی بذر شوید با دارا بودن مواد آنتی اکسیدانی از قبیل فیبل فیتواسترول ها، کومارین و کوئرستین موجب کاهش معنی داری در مقادیر کلسترول سرم و مهار پراکسیداسیون لیپیدها و خنثی سازی رادیکال های آزاد و مهار استرس اکسیداتیو می شود. فلاونوئیدهای موجود در عصاره ی بذر شوید خاصیت کاهش دهنده ی چربی و قند خون دارند و نقش مهمی در درمان هایپرکلسترولمی ایفا می کنند. طبق مطالعات ریزبینی مشخص شد که هایپرکلسترولمی موجب تخریب بافت بیضه می شود، اما درمان با عصاره ی بذر شوید باعث بهبود این وضعیت می شود. درگروه کنترل مثبت، عصاره ی بذر شوید موجب اختلال در فرآیند اسپرماتوژنز نسبت به گروه کنترل سالم می شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه ی مقطع کارشناسی ارشد می باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی و آموزشی دانشگاه ارومیه (به شماره ی ۲۶۵-۲ع) که در تأمین هزینه های این مقاله ما را یاری کردند قدردانی می گردد.

منابع

1. Davis, H. R. P., K.K.; Alton, K.B.; Burrier, R.E. and Watkins, R.W. (2001). The synergistic hypocholesterolemic activity of the potent cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in combination with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors in dogs. Metabolism, 1234-1241.

2. Lil, J. L., Stantman, F.W., Lardy, H.A. (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Arch Biochem Biophys, 263(1), 150-156

3. Leal MC, B.-S. S., Chiarini-Garcia H, Franca LR. (2004). Sertoli cell efficiency and daily sperm production in goats (capra hircus). Anim Reprod, 1, 122-128.

4. SanaaR.Galaly, w. G. H., Kamal A. Amin. (2014). Effects of orlistat and herbal mixture extract on brain, testes functions and oxidative stress bio markers in a rat model of high fat date.
5.Gulaya NM, M. V., Govseeva NM, Klimashevsky VM, Gorpynchenko II, Boyko MI. (2001). Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. Arch Androl; 46:169-
6. Diaz-Fontdevila M, B.-O. E. (1993). Cholesterol and polyunsaturated acid enriched diet: effect on kinetics of the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. Mol Reprod Dev, 35, 80-176.
7.Fanaei H, K. S., Bahmanpour S, Ghannadi A, Kazeroni M. (2011). Beneficial effects of alpha-tocopherol against intracellular calcium overload in human sperm. Reprod Sci. 18.
8. Thiyagarajan B, Valivittan K. Ameliorating effect of vitaymin E on in vitro development of preimplantation buffalo embryos. J Assist Reprod Genet. (2009);26(4):217-25
9. Bansal AK, B. G. (2010-2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. Vet Med Int, 1-7.
10. Naseri, a. (1379). effects of essential anethum garaveolens on serum concentration cholesterol, TG in hyperlipidemia rats, professional Ph.D. school of pharmacy, Isfahan university of medical sciences.
11. Nuraliev, I. N. A., G.A..:. (1992). the efficacy of quercetin in alloxan diabetes.EKS.Klin. Farmakol. 55,42-44.
12. Drotman, R., Lawhan, G. (1978). Serum enzymes are indications of chemical induced liver damage. Drug Chem Toxicol, 1(2), 163.
13. Yazdanparast R, B. S. (2008). Evaluation of the effect of Anethum graveolens L.crude extracts on serum lipids and lipoproteinsprofiles in hypercholesterolemia rats. Scopus.
14. Tozyo T, Y. Y., Sakurai K, et al. (1994). Novel antitumor sesquiterpenoids in Achillea mille folium. Chem Pharm Bull (Tokyo), 42(5), 1096-1100.
15. Kilarkaje N. (2008). A purine nucleoside analogue-acyclovir[9-(2-hydroxyethoxymthyl)-9h guanine] reversibly impairs testicular function in mouse. The journal of toxicological sciences,33(1):61-70.
16.Wong A, C. S., Patton WC, Jacobson JD, Corselli J, Chan PJ. (2008). Addition of eosin to the aniline blue assay to enhance detection of immature sperm histones. Fertil Steril., 90(5), 1999-2002.
17. Amiri. L, B. k. S. M., Sheykhzadeh hesariF, Dehghan G. (2013). The effect of hidroalcoholic extract of Terfezia boudieri fungus on the testicular tissue. 43-46.
18. Ashraf H, K. F., Rafiee Raki F, Nejati V. (J 2013). Evaluation of aqueous extract of erberis integerrima root on the testistissue and testosterone levels in stereptozotocine (stz) induced diabetic rats. Qom Univ Med Sci, 7(4), 28-35.
19. Khayatnori MH, K. A., Safavi A, Sarafinoori H. (2010). Effect of growth hormone on the testis and the index spermatogenesis following administration of methotrexate in rat. . J Vet Med (Sanandaj), 3(9), 77-85.
20. Malini T, V. G. (1991). Antifertility effects of beta-sitosterol in malealbino rats. Ethnopharmacol. 35,149-153.
21. Chitra KC, M. P. (2004 Feb). Vitamin E prevents nonylphenol-inducedoxidative stress in testis of rats. Indian J Exp Biol. 42(2), 220-223.
22. Balhorn R. (1982). A model for the structure ofchromatin in mammalian sperm J Cell Biol, 93(2), 298-305.
23. Agarwal A., D. N. R., Ruffoli R., and Carip A. (2008). Lifestyle and testicular dysfunction. A brief update.Biomedicin & Pharmacotherapy, 62, 550-553.
24. L, E. (1993). Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications, in: Active oxygen, lipid peroxides and antioxidants. Boca Raton CRC Press, 1-38.
25. Vargas AJ, B. R. (2010). Hormesis and synergy: Pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Nutr Rev, 68(7), 418-428.

26. Levi AJ, F. A., Hughes L, HendryWF. (1979). Male infertility due to sulphasalazine. Lancet, 2, 276-278.
27. Amin A, Hamza AA. (2006). Effects of Roselle and Gingeron cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. Asian J Androl.2006; 8(5): 607-12.
28. Kim HP, M. I., Iversen L, Ziboh VA. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 58(1), 17-24.
29. Rifai N., B. P., Albers JJ. (1999). Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3nd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 809-861.
30. Kaviarasam KM., A. M., Pugalendi K. (2005). Lipid profile, oxidant-antioxidant status and glycoprotein components in hyperlipidemic patients with/without diabetes. Journal of clinical chemistry 362, 49-56.