Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2017; 20(118): 69-83

Effect of Supplementing Mouse Maternal Diet during Pregnant and Weaning Period by Fish Oil and Vitamin E on Male Offspring Reproductive Organs

Fahimeh Zare Ebrahim Abad[1], Abdolhosein Shahverdi[2*], Mitra Heidari Nasr Abadi[3], Alireza Alizadeh[4]

1. MSc Student of Animal Sciences, Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Animal Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Embryology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

Received: 20 Jul 2016, Accepted: 17 Jun 2017

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate the effect of fed fish oil (FO) with or without vitamin E for mothers on the testis cells of male offsprings.

Materials and Methods: Sixty mature female NMRI mice were divided into different groups: **control (CTR**; Standard diet(vitamin E 50 mg IU/kg) pre and postnatal period); **I)** Gavages 0.01 ml/day/mother fish oil (FO)+CTR diet during prenatal period; **II)** Gavages FO+CTR diet during postnatal period; **III)** consumed VITE(125 mg IU/kg) 2.5 folded greater than standard recommendations(2×)during prenatal period; **IV)**consumed VITE(2×)diet during pre and postnatal period; **V**)consumed VITE(2×)diet during postnatal period; **VI)** Gavages FO+VITE(2×) diet during prenatal period; **VII)** Gavage FO+VITE(2×)diet during postnatal period ;**VIII)** Gavages FO+VITE (2×)diet during pre and postnatal period. After weaning, the testes were collected and histological data were analyzed using SAS software by Duncan test.

Results: testes cells length, width and weight was lower in offspring which their mothers fed FO+CTR diet during prenatal, ($p<0.05$).Vitamin E consumption during postnatal period improved these parameters ($p<0.05$). Spermatogoni (47 *vs.* 43), spermatocyte (43 *vs.* 34), Spermatid (63 *vs.* 44), Sertoli (0.9 *vs.* 2), and Leydig (3 vs. 1.7) were increased as FO+VITE was used than CTR ($p<0.05$).

Conclusion: The positive effects of supplementation maternal diet by FO with VITE or sole VITE was observed. Thus, antioxidants should be consumed along with omega-3 fatty acids in maternal diet.

Keywords: Fish oil, Maternal nutrition, Offspring testes, Vitamin E

*Corresponding Author:
Address: Hafez Alley, North BaniHashem Avenue, Resalat Highway, Tehran, Iran
Email: shahverdi@royaninstitute.org

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۰، شماره ۱ (شماره پیاپی ۱۱۸)، فروردین ۱۳۹۶، ۸۳-۶۹

تأثیر مصرف روغن ماهی و ویتامین E در جیره غذایی موش سوری مادر باردار و شیرده بر سلول‌های جنسی فرزندان نر پس از شیرگیری

فهیمه زارع ابراهیم آباد[۱]، عبدالحسین شاهوردی[۲*]، میترا حیدری نصرآبادی[۳]، علیرضا علیزاده[۴]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد علوم جانوری، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲.دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران

۳.دانشیار، گروه زیست شناسی جانوری، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴.استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه، بررسی اثر روغن ماهی و بدون ویتامین E در موش‌های مادر برکیفیت سلول‌های بیضه نتاج پیش از بلوغ بود.

مواد و روش‌ها: ۶۰ سر موش ماده بالغ نژاد NMRI به گروه‌های:کنترل(رژیم غذایی استاندارد حاوی ۵۰ میلی‌گرم واحد بین‌المللی ویتامین E بر کیلوگرم خوراک قبل و بعد از زایمان)، ۱)تغذیه با جیره کنترل+گاواژ روغن ماهی(۰/۰۱ میلی‌لیتر در روز برای هر موش) قبل از زایمان، ۲)تغذیه با جیره کنترل+گاواژ روغن ماهی بعد از زایمان، ۳)مصرف جیره حاوی ۲/۵ برابر استاندارد ویتامین E(۱۲۵ میلی‌گرم واحد بین‌المللی بر کیلوگرم جیره)قبل از زایمان، ۴)مصرف جیره حاوی ویتامین E قبل و بعد از زایمان، ۵)مصرف جیره حاوی ویتامین E بعد از زایمان، ۶)گاواژ روغن ماهی و مصرف ویتامین E قبل از زایمان، ۷)گاواژ روغن ماهی و مصرف ویتامین E بعد از زایمان، ۸)گاواژ روغن ماهی و مصرف ویتامین E قبل و بعد از زایمان تقسیم شدند. پس از شیرگیری، نمونه‌های بیضه جمع‌آوری وآنالیزهای بافت شناسی انجام شدند. نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SAS و آزمون دانکن بررسی گردید.

یافته‌ها: سلول‌های جنسی، طول، عرض و وزن بیضه در فرزندانی که مادران آن‌ها در دوران بارداری روغن ماهی به تنهایی مصرف کرده بودند، کمتر بود($p<۰/۰۵$). این شاخص‌ها در گروه مصرف کننده ویتامین E به تنهایی بعد از زایمان بهبود یافته بود($p<۰/۰۵$). مصرف توام روغن ماهی و ویتامین E پس از زایمان، اثرات چشم‌گیری بر تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی(۴۷ در مقابل ۴۳)، اسپرماتوسیت(۴۳ در مقابل ۳۴)، اسپرماتید(۶۳ در مقابل ۴۴)، سرتولی(۲ در مقابل ۰/۹)و لیدیگ(۳ در مقابل ۱/۷)در مقایسه با گروه کنترل داشت($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از اثرات مثبت روغن ماهی با ویتامین E و ویتامین E به تنهایی بود. بنابراین، آنتی اکسیدان باید به همراه اسیدهای چرب امگا-۳ در تغذیه مادری مصرف شود.

واژگان کلیدی: بیضه نتاج، تغذیه مادری، روغن ماهی، ویتامین E

***نویسنده مسئول:** ایران، تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی هاشم شمالی، کوی حافظ

Email: shahverdi@royaninstitute.org

مقدمه

اثرات تغذیه مادری بر سلامت و بیماری‌های آینده فرزندان، برای اولین بار توسط بارکر(۱۹۹۷) مطرح شد(۱). رابطه تغذیه و تولید مثل نیز سال‌هاست که مورد مطالعه قرار می‌گیرد. اما در خصوص اثرات تغذیه مادری بر باروری و ناباروری فرزندان نر مطالعات محدودی انجام شده و اغلب آن‌ها اثرات سوء تغذیه مادر را بررسی کرده‌اند. از طرف دیگر، امروزه توصیه مصرف روغن ماهی برای مادران باردار به منظور افزایش هوش یا قدرت بینایی فرزندان بسیار رایج است در حالی که با توجه به نقش کلیدی اسیدهای چرب در تولیدمثل، توجه به اثرات آن‌ها در باروری فرزندان ضروری به نظر می‌رسد. تغذیه مناسب بر روی فرآیندهایی مانند اسپرماتوژنز، اوژنز، لقاح و لانه گزینی تاثیر گذار است. در میان مواد مغذی مختلف اسیدهای چرب خصوصا اسیدهای چرب غیر اشباع با چند پیوند دو گانه (Polyunsaturated fatty acids :PUFA) تاثیر شگفت انگیزی در عملکرد تولید مثلی در جنس نر و ماده دارند. اسیدهای چرب به دو دسته اشباع و غیراشباع تقسیم بندی می شوند و اسیدهای چرب امگا-۳، گروهی از اسیدهای چرب غیراشباع هستند که اثرات مثبت آن‌ها در سلامتی تایید شده است(۲).

مهم‌ترین اسیدهای چرب امگا-۳، اسید لینولئیک (LA: Linoleic acid)، ایکوزاپنتانوئیک اسید(Eicosapentaenoic acid; C20:5 n-3:EPA) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA: docosahexaenoic acid; C22:6 n-3) می‌باشند. EPA و DHA در ماهی‌هایی هم چون سالمون و از جمله در روغن ماهی یافت می‌شوند. نقش کلیدی اسیدهای چرب امگا-۳ در تولیدمثل مشخص شده است(۳). نکته قابل توجه اثرات چشم‌گیر این گروه از اسیدهای چرب در تولید مثل جنس نر است(۴). سطوح بالایی از DHA در بیضه و نیز سر یا دم اسپرم در میان گونه‌های مختلف گزارش شده است. نسبت‌های متفاوت از اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشاهای سلولی انعکاسی از مقادیر مصرف آن در جیره غذایی فرد است، به طوری که مکمل‌های اسیدهای چرب از طریق تنظیم غلظت آنزیم‌ها و تاثیر بر ژن‌ها در مسیر سنتز و تنظیم پروستاگلاندین‌ها و استروئیدها تاثیر گذاشته و به این ترتیب تنظیم عملکرد تولید مثلی را سبب می‌شوند(۹). ملدجیان و همکاران(۲۰۰۵)در مطالعات خود دریافتند که تغییر در محتوای اسید چرب در جیره باعث تغییر در محتوای اسید چرب و کیفیت اسپرم در خوک و بوقلمون می‌شود(۹). نتایج تحقیقات یادیم و همکاران در سال ۲۰۰۰ در رت در زمان بلوغ نشان می‌دهد که اسیدهای چرب خانواده امگا- ۶ از جمله اسیدلینولئیک برای رشد بیضه ضروری هستند؛ ولی در طولانی مدت برای حفظ ساختار طبیعی بیضه و اسپرماتوژنز ضرورتی ندارند. از طرفی کمبود چربی در رژیم غذایی تاثیر مخربی روی قابلیت تولید مثلی دارد مانند کاهش تخمک گذاری‌های منظم در ماده‌ها و نیز کاهش باروری و فعالیت جنسی در نر(۶).

به نظر می‌رسد، تغذیه مادری اهمیت زیادی در کیفیت تولیدمثل فرزندان دارد. سیتر و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که کمبود اسیدهای چرب ضروری در نوزادانی که تازه از شیرگرفته شده اند، باعث اختلال در اسپرماتوژنز می‌شود(۷). از طرفی محققان در ۲۰۱۱ نشان دادند که کمبود اسید چرب امگا- ۳ در موش منجر به عدم تشکیل آکروزوم می‌شود(۴۲). این موضوع به این دلیل است که بقاء و حیات آکروزوم در لوله سمنی فروس بیضه تحت تاثیر مستقیم DHA بوده و در صورت کمبود آن، تکامل دانه‌های پرو آکروزومی متوقف می‌شود. در واقع کمبود DHA منجر به توقف مرحله دوم اسپرمیوژنز می‌گردد(۴۳).

منبع تامین اسیدهای چرب امگا-۳ در نوزادان شیرخوار، از طریق شیر مادر است. در سال۲۰۱۱ محققان بیان کردند که اگر مادران دچار کمبود برخی اسیدهای چرب باشند این کمبود در ترکیب شیر آن‌ها نیز منعکس خواهد شد و بنابر این نوزادان آن‌ها ممکن است عوارض مصرف ناکافی اسیدهای چرب را بروز دهند(۴۱).هرچند نشان داده شده است

که شیر مادر مهم‌ترین منبع اسیدهای چرب چند گانه غیر اشباع در طول ۲ سال اول زندگی است؛ اما DHA در شیر مادر کم است و بسیار وابسته به رژیم غذایی مادر است. بنابراین، با تغذیه DHA برای مادران باردار و شیرده، آن‌ها این اسید چرب را به نوزاد انتقال داده که پیامدهای کوتاه مدت و بلند مدتی روی عملکرد ارگان‌های مختلف مانند مغز، چشم و سیستم ایمنی و تولید مثلی دارد(۸). از طرفی در مطالعات بیان شده است که سطح پایین امگا-۳ باعث ابتلا نوزادان به بیماری آلرژیک می‌شود و مصرف DHA و EPA در دوران بارداری می‌تواند این بیماری را در نوزادان و کودکان کاهش دهد(۳۹). در همین راستا، مین و همکاران در سال ۲۰۱۴،گزارش کردند که مصرف روزانه ۶۰۰ میلی‌گرم DHA باعث بهبود عملکرد غشاء سلولی و جلوگیری از کاهش DHA مادر در طول بارداری می‌شود(۴۰). اخیراً، در سال ۲۰۱۵ محققان نشان دادند که چالش‌های التهابی در دوره نوزادی از طریق مکمل سازی مادران با مواد آلی- معدنی بر پاسخ ایمنی نوزادان اثرات چشم‌گیری دارد(۳۸).

لازم به ذکر است که مطالعات متعدد اثرات مثبت مکمل اسیدهای چرب رژیم غذایی مادر بر سیستم عصبی و بینایی فرزندان را تایید نموده‌اند(۲۷). نکته قابل تامل این است که غلظت بالای اسیدهای چرب امگا-۳، و به طور ویژه اسید DHA نقطه مشترک سه ارگان مغز، شبکیه و بیضه است. بنابراین، توصیه مصرف مکمل روغن ماهی برای مادر به منظور بهبود عملکرد مغز و بینایی مطلوب به نظر می‌رسد؛ اما تا به حال مطالعه‌ای انجام نشده است که اهمیت مکمل سازی تغذیه مادری را برای تولیدمثل فرزند بررسی نماید. به عبارت بهتر ممکن است مصرف مکمل در مادر اثرات مطلوب بر مغز یا شبکیه داشته باشد؛ اما تاثیرات مثبت و منفی آن بر بیضه نتاج مشخص نشده است. به عنوان یک حقیقت تغذیه‌ای، با افزایش میزان اسیدهای چرب رژیم غذایی باید مقدار آنتی اکسیدان رژیم غذایی را افزایش داد. در مجموع، مطالعه جامع حاضر با هدف تعیین اثرات این مکمل‌ها(روغن ماهی، ویتامین E و ترکیب آن‌ها) بر اندام تولیدمثلی فرزند نر پیش از بلوغ، طراحی و انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در قالب طرح کاملا تصادفی با تداخل در تغذیه مادران و بررسی اثرات آن در فرزندان نر انجام شد. در این تحقیق ۶۰ سر موش ماده بالغ ، نژاد(Naval Medical Research Institute) NMRI از انیستیتو پاستور خریداری و در بخش حیوانات آزمایشگاهی پژوهشگاه رویان تهران، در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و با تغذیه مناسب به مدت یک هفته به منظور عادت کردن به محیط نگهداری شدند. موش‌های ماده با وزن اولیه حدود ۲۰ گرم(ترازوی دیجیتال ACCULAB، آمریکا) به طور کاملا تصادفی با تداخل مصرف و مقایسه با شاهد به نه گروه تقسیم شدند به طوری که میانگین وزن کلیه گروه‌ها یکسان بود. مصرف رژیم‌های غذایی و انجام گاواژ بلافاصله پس از تایید حاملگی، در گروه‌های مورد نظر در موش‌های آبستن انجام گرفت. با توجه به نوع گروه آزمایشی، رژیم غذایی و مدت مصرف آن متفاوت بود. گروه کنترل: موش‌های مادر که جیره غذایی آنها فاقد هر گونه مکمل اضافی یا اسید چرب در دوران بارداری و پس از زایمان بودند و میزان ویتامین E برابر توصیه‌های رایج، ۵۰ میلی‌گرم واحد بین المللی/کیلوگرم جیره غذایی بود. گروه آزمایشی ۱: موش‌های مادر مصرف کننده جیره غذایی کنترل در دوران بارداری که با روغن ماهی(۰/۰۱ ml/day) گاواژ شدند. گروه آزمایشی ۲: موش‌های مادر مصرف کننده جیره غذایی کنترل که در دوران پس از زایمان با روغن ماهی (ml/ day ۰/۰۱) گاواژ شدند. موش‌های مادر در دوران بارداری و پس از زایمان از روغن ماهی(۰/۰۱ ml/ day) استفاده کردند (این گروه نتوانست مراحل آزمایش را به طور کامل پشت سر بگذارد و بنابراین حذف شد). گروه آزمایشی ۳: موش‌های مادر در دوران بارداری جیره غذایی مکمل شده با ویتامین E

(۱۲۵ میلی‌گرم واحد بین المللی/ کیلوگرم جیره) استفاده کردند. گروه آزمایشی ۴: موش‌های مادر در دوران بارداری و شیردهی جیره حاوی مکمل ویتامین E استفاده کردند. گروه آزمایشی ۵: موش‌های مادر در دوران شیردهی جیره حاوی مکمل ویتامین E استفاده کردند. گروه آزمایشی ۶: موش‌های مادر در دوران بارداری با روغن ماهی گاواژ شدند و جیره غذایی حاوی مکمل ویتامین E استفاده کردند. گروه آزمایشی ۷: موش‌های مادر در دوران شیردهی روغن ماهی به همراه ویتامین E استفاده کردند. گروه آزمایشی ۸: موش‌های مادر در دوران بارداری و شیردهی روغن ماهی به همراه ویتامین E استفاده کردند. منبع روغن ماهی، کپسول روغن ماهی(شرکت Nutravite، کانادا) حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم اسید چرب امگا-۳ در هر میلی‌لیتر بود(۱۸۰ میلی‌گرم EPA +۱۲۰ میلی‌گرم DHA). تغذیه روغن ماهی برای موش‌های مادر بر اساس گروه آزمایشی به صورت دهانی (گاواژ روزانه) انجام شد. مدت زمان تغذیه متفاوت بوده و در گروه‌های مصرف کننده طی مدت آبستنی ۲۱ روز و برای گروه‌های شیردهی ۴ هفته و برای گروه‌های قبل و بعد زایمان، ۴۹ روز بود. نوزادان گروه‌های مختلف پس از شیرگیری (در سن چهار هفتگی) کشتار شدند و نمونه بیضه آن‌ها خارج شد. ابتدا وزن بدن (ترازوی دیجیتال ACCULAB ، آمریکا)، وزن بیضه و نیز طول و عرض بیضه به وسیله کولیس دیجیتال(PREISSER، اسپانیا) اندازه‌گیری شد. سپس به منظور مطالعات بافت شناسی، نمونه مورد نظر در محلول فیکساتیو(فرمالین ۱۰ درصد) قرار داده شد. در مرحله بعد، فرآیند پاساژ بافتی طی مراحلی که ذکر خواهد شد انجام گرفت.

مرحله آب‌گیری: محلول تثبیت کننده که در ابتدای کار استفاده می‌شود با پارافین سازگار نیست؛ بنابراین مرحله آب‌گیری به منظور خارج ساختن تثبیت کننده از بافت ضروری است. این کار با انتقال بافت از یک سری محلول الکل با غلظت در حال افزایش انجام می‌شود. درصد اولین محلول الکل و هم‌چنین زمان‌های مورد نیاز تجربی است و بستگی به نوع محلول تثبیت کننده و اندازه و نوع بافت دارد. زمان و درصدهای مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: الکل ۷۰ درصد درجه یک ۱ساعت، الکل ۷۰ درصد درجه دو ۱ ساعت، الکل ۹۰ درصد درجه یک ۱ساعت، الکل ۹۰ درصد درجه دو ۱ ساعت، الکل ۹۶ درصد درجه یک ۱ ساعت، الکل ۹۶ درصد درجه دو ۲ ساعت، الکل مطلق یک ۱ ساعت و الکل مطلق دو ۱ ساعت.

شفاف سازی: به مدت ۲ساعت نمونه‌ها در ۲ حجم زایلل، یک ساعت در مخلوط زایلل با پارافین و در پایان به مدت ۲ ساعت در ۲ حجم پارافین برای شفاف‌سازی نمونه‌ها قرار گرفتند.

بلوک گیری: در مرحله بعد پس از پاساژ بافتی، بلوک‌گیری نمونه‌ها انجام شد. برای قالب نمونه‌ها در پارافین از یک سطح صاف آلومینیومی جهت قرار دادن قالب گیری فلزی L مانند بر روی آن استفاده شد. سپس دو قطعه قالب L مانند مقابل هم روی سطح آلومینیومی قرار داده شد که بسته به اندازه نمونه اندازه قالب قابل تنظیم کردن بود. پس از آماده‌سازی قالب پارافین ذوب شده با دمای حدود ۵۸ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه مخصوص بلوک‌گیری پارافین به داخل قالب منتقل شد و بلافاصله نمونه‌های مربوط به هر بیضه از داخل بسکت به داخل قالب حاوی پارافین منتقل شدند. مشخصات هر برش نیز روی کاغذ یادداشت شد و به وسیله پارافین به بلوک پارافین چسبانده شد. بعد از سرد و سفت شدن پارافین در دمای محیطی قالب ها با ضربه مختصر از پارافین جامد حاوی نمونه‌ها جدا گردید و بلوک و تا زمان برش‌گیری در دمای محیط نگهداری شد تا کاملا سفت و محکم شود. برش‌گیری از بلوک‌های پارافینی حاوی نمونه، توسط میکروتوم صورت گرفت. در ابتدا بلوک پارافینی درمحل مخصوص در میکروتوم نصب شد و سپس برش‌های مورد نظر از بلوک‌ها تهیه شد. به منظور تهیه مقاطع بافتی مناسب برای مطالعات هیستولوژیک در تعیین حجم باید جهت اولیه حفظ شود. از بلوک‌های مربوط به بیضه هر موش مقاطعی به ضخامت ۵

میکرون تهیه شد .به این ترتیب که ابتدا تعدادی برش زده شد تا تمام بافت بیضه در داخل یک مقطع قرار گیرد. پس از غوطه ورسازی مقطع با حفظ جهت بر روی الکل ۳۰ درجه برای رفع چروکیدگی و بر روی حمام آب گرم با درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای باز شدن کامل نمونه ها مقطع به روی لام منتقل شد. مشخصات برش روی لام ثبت و سپس لام‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در داخل فوز ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تا نمونه‌ها به طور کامل و بهتر بر روی لام بچسبد. سپس رنگ آمیزی لام ها با هماتوکسین – ائوزین انجام گرفت. لام‌ها در رک‌های مخصوص رنگ آمیزی و در جام‌های مختلف قرار گرفت تا رنگ آمیزی تکمیل شود: زایلل ۵دقیقه، زایلل ۵ دقیقه، الکل ۱۰۰ درصد ۵دقیقه، الکل ۹۶ درصد ۵ دقیقه، الکل ۷۰ درصد ۵ دقیقه، شستشو با آب جاری، هماتوکسیلین ۴دقیقه، شستشو با آب جاری، اسید الکل به مدت خیلی کوتاه، شستشو با آب جاری، ائوزین ۵۰- ۴۰ ثانیه، الکل ۷۰ درصد ۱ دقیقه، الکل ۹۰ درصد ۱دقیقه، الکل ۹۰ درصد ۱ دقیقه، الکل ۱۰۰ درصد یک دقیقه، الکل ۱۰۰ درصد ۱ دقیقه، زایلل ۵ دقیقه، زایلل ۵ دقیقه. در این روش هسته‌ها توسط هماتوکسین به رنگ بنفش و سیتوپلاسم توسط ائوزین به رنگ صورتی در می‌آیند، سپس بین نمونه‌های موجود بر روی لام چسب انتالن زده شد و بعد لامل با زاویه ۴۵ درجه بر روی لام قرار گرفت تا چسب کاملاً خشک شود. در نهایت بررسی هیستولوژی بافت بیضه در گروه‌های مختلف و شمارش سلول‌های جنسی با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام شد. لوله‌های منی ساز که به شکل تصادفی انتخاب شده بودند، توسط صفحه مدرج که بر روی عدسی چشمی میکروسکوپ نوری (Olympus B×41TEساخت ژاپن) قرار گرفت و با عدسی ۱۰ مورد بررسی هیستولوژیکی قرار گرفتند. هم‌چنین تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و سلول‌های لیدیگ و سرتولی، در هر لام در ۱۰ میدان دید متفاوت با عدسی۴۰ میکروسکوپ نوری شمارش شدند.

روش تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های به دست آمده از گروه‌های مختلف با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور در قالب رویه GLM و مقایسه ANOVA در قالب طرح کاملا تصادفی و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای آنالیز استفاده شده بود. سطح معنی داری ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن موش‌های نر در گروه کنترل، در گروه ۵ (ویتامین E بعد از زایمان) و گروه ۷ (روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان) به ترتیب ۱۹۸۷±۱۰۶۰۴، ۲۵۷۷±۲۲۳۶۸ و ۶۲۰۳±۲۰۵۸۱ میلی‌گرم بود که اختلاف معناداری بین آن‌ها مشاهده شد($p<۰/۰۵$). هم‌چنین، وزن بیضه در گروه ۵ (ویتامینE بعد از زایمان ۱۲/۹± ۶۰/۴) و گروه ۷(روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان/۱۲/۴±۵۲/۵) در مقایسه با گروه کنترل (۷/۱۴± ۳۰/۴) افزایش چشم‌گیری داشت($p<۰/۰۵$). طول بیضه (۳/۱۰±۰/۳ ، ۵/۵۹±۰/۵۶ ، ۵/۴۸±۰/۸۲ میلی‌متر)، عرض بیضه (۲/۷۵±۰/۳۴ ، ۴/۱۲ ± ۰/۱۲ ، ۴±۰/۳۴ میلی متر) و نیز نسبت وزن بیضه به وزن بدن در گروه آزمایشی ۵ (ویتامین E بعد از زایمان) (۰/۲۶۸±۰/۰۳۴) و ۷ (روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان) (۰/۲۶۱±۰/۰۲۶) نسبت به گروه کنترل (۲۲۸±۰/۰۲۱ /۰) افزایش معنی داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱).

جدول ۱. وزن بدن، وزن بیضه، نسبت وزن بیضه به وزن بدن، طول و عرض بیضه در گروه‌های آزمایشی. مقادیر به صورت mean± SEM بیان شده است.

گروه	وزن بدن میلی گرم	وزن بیضه میلی گرم	نسبت وزن بیضه به وزن بدن میلی گرم	طول بیضه میلی متر	عرض بیضه میلی متر
کنترل (استاندارد)	۱۰۶۰۴±۱۹۸۷ d	۳۰/۴±۷/۱۴ e	۰/۲۲۸±۰/۰۲۱ b	۳/۱۰±۰/۳ d	۲/۷۵±۰/۳۴ C
گروه ۱ (استاندارد +روغن ماهی قبل از زایمان)	۱۱۸۰۲±۱۷۵۰ d	۳۳±۴/۵ e	۰/۲۲۴±۰/۰۲۳ b	۳/۳۵±۰/۲۱ d	۲/۳۰±۰/۲۱ c
گروه ۲ (استاندارد +روغن ماهی بعد از زایمان)	۱۴۲۶۸±۲۱۷۸ c	۳۸±۷/۷ d	۰/۲۳۸±۰/۰۳۴ b	۴/۳۸±۰/۸۹ c	۳/۷۵±۰/۳۶ b
گروه ۳ (ویتامین E قبل از زایمان)	- 	۴۰/۸± ۱۰ d	- 	۴/۷±۰/۶۳ c	۳/۲۵±۰/۴ b
گروه ۴ (ویتامین E قبل و بعد از زایمان)	۱۵۹۸۶±۲۵۰۹ c	۴۴± ۶/۲ b	۰/۲۷۴±۰/۰۳۴ a	۵/۰۲±۰/۳۰ b	۳/۶۶±۰/۳ b
گروه ۵ (ویتامین E بعد از زایمان)	۲۲۳۶۸±۲۵۷۷ a	۶۰/۴±۱۲/۹ a	۰/۲۶۸±۰/۰۳۴ a	۵/۵۹±۰/۵۶ a	۴/۱۲±۰/۲۱ a
گروه ۶ (روغن ماهی+ویتامینE قبل از زایمان)	- 	۴۲±۲/۳ b	- 	۳/۶ d	۲/۴۶ c
گروه ۷ (روغن ماهی+ ویتامین Eبعد از زایمان)	۲۰۵۸۱± ۶۲۰۳ a	۵۲/۵±۱۲/۴ a	۰/۲۶۱±۰/۰۲۶ a	۵/۴۸±۰/۸۲ a	۴±۰/۳۴ a
گروه ۸ (روغن ماهی+ ویتامین E قبل و بعد از زایمان)	۱۷۰۵۳±۲۱۵۸ b	۴۲±۳/۴۶ b	۰/۲۴۶±۰/۰۳۵ b	۵±۰/۱۶ b	۳/۵۲±۰/۲۵ b

a,b,c,d: حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنادار بین میانگین ها می باشد($p< ۰/۰۵$).

اسپرماتوژنز در گروه کنترل و گروه ۵ (ویتامین Eبعد از زایمان) و ۷ (روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان) طبیعی بود و اپیتلیوم زایشی لوله‌ها شکل طبیعی و سلول‌های آن‌ها آرایش منظمی داشتند و هیچ‌گونه پیکنوزه شدن در سلول‌ها مشاهده نشد. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه آزمایشی ۵ (ویتامین E بعد از زایمان) (۲/۲۵±۵۰/۱) و گروه ۷ (روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان) (۲/۲۵±۴۷/۶) و گروه ۸ (روغن ماهی و ویتامین E قبل و بعد از زایمان) (۲/۲۵±۴۵/۱) نسبت به گروه کنترل(۲/۲۵±۴۳/۶) افزایش معنی داری را نشان داد($p<۰/۰۵$). از طرفی تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه کنترل (۱/۷۲±۳۴/۲) نسبت به گروه آزمایشی۵ (ویتامینE بعد از زایمان) (۱/۷۲±۴۵/۱) و گروه ۸ (روغن ماهی و ویتامین E قبل و بعد از زایمان) (۱/۷۲±۳۸/۱) کاهش معنی داری داشت($p<۰/۰۵$). در گروه آزمایشی ۴(ویتامین E قبل و بعد از زایمان) ارتفاع اپی تلیوم زایشی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری داشت، از طرفی

سلول‌های آن‌ها آرایش نامنظمی داشتند و پیکنوزه شدن در سلول‌ها مشاهده شد. تراکم اسپرماتید(۴/۲۵±۵۰/۹) نسبت به گروه کنترل(۴/۲۵±۴۴/۲) افزایش معنی داری را نشان داد (p<۰/۰۵)(جدول ۲).

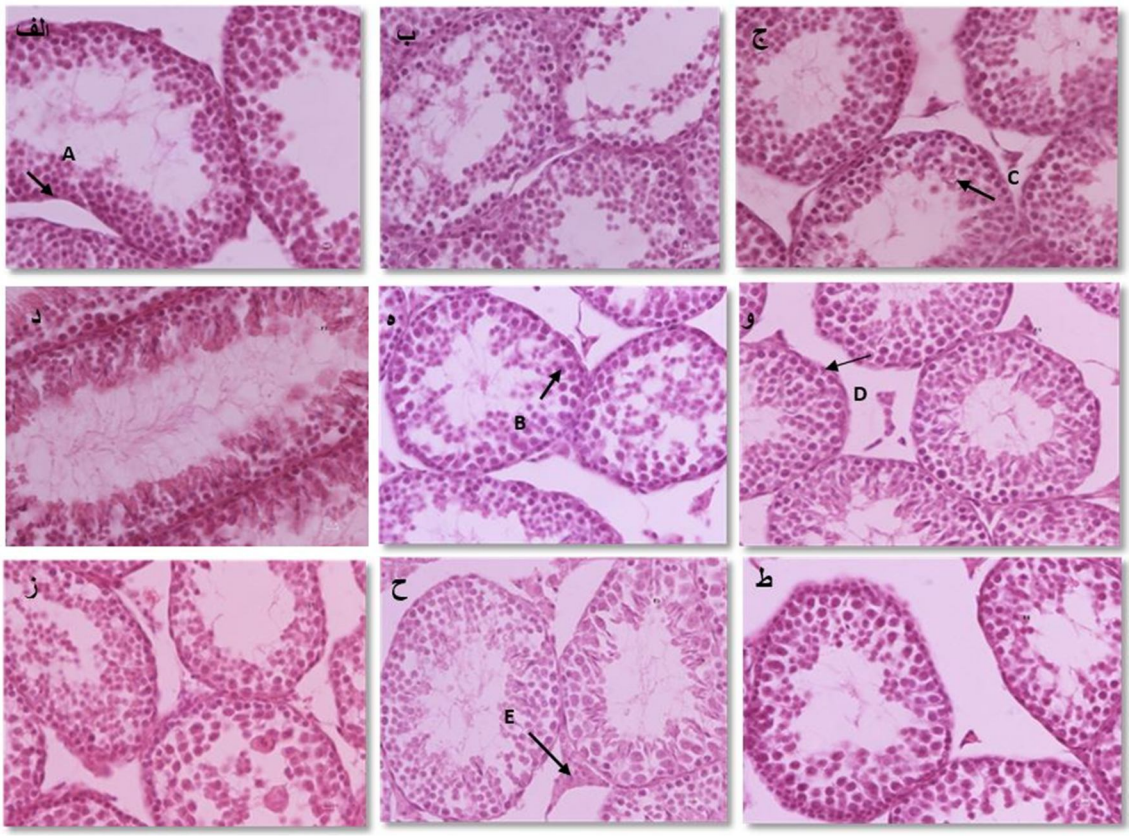
جدول ۲: نتایج حاصل از شمارش سلول های جنسی در گروه های آزمایشی. مقادیر به صورت mean± SEM بیان شده است.

گروه	اسپرماتوگونی	اسپرماتوسیت	اسپرماتید	سرتولی	لیدیگ
کنترل (استاندارد)	۴۳/۶±۲/۲۵ b	۳۴/۲±۱/۷۲ b	۴۴/۲±۴/۲۵ c	۰/۹±۰/۱۸ c	۱/۷±۰/ ۳۹ c
گروه ۱ (استاندارد +روغن ماهی قبل از زایمان)	۴۲/۱±۲/۲۵b	۳۶/۶±۱/۷۲ b	۴۸/۶±۴/۲۵ c	۱/۳±۰/۱۸ b	۱/۳±۰/۳۹ c
گروه ۲ (استاندارد +روغن ماهی بعد از زایمان)	۴۴/۱±۲/۲۵ b	۳۷/۳±۱/۷۲ b	۵۱/۶±۴/۲۵ b	۱/۷±۰/۱۸ b	۲/۷±۰/۳۹ b
گروه ۳ (ویتامین E قبل از زایمان)	۴۰/۸±۲/۲۵ b	۳۹±۱/۷۲ b	۵۱/۱±۴/۲۵ b	۱/۴±۰/۱۸ b	۲±۰/۳۹ b
گروه ۴(ویتامین E قبل و بعد از زایمان)	۴۳/۸±۲/۲۵ b	۳۸/۱±۱/۷۲ b	۵۰/۹±۴/۲۵ b	۱/۶±۰/۱۸ b	۱/۹±۰/۳۹ c
گروه ۵(ویتامین E بعد از زایمان)	۵۰/۱±۲/۲۵ a	۴۵/۱±۱/۷۲ a	۶۱/۱±۴/۲۵ a	۲/۱±۰/۱۸ a	۳/۹±۰/۳۹ a
گروه ۶ (روغن ماهی+ویتامین E قبل از زایمان)	۴۰/۶±۲/۲۵ b	۳۷/۱±۱/۷۲ b	۵۴/۸±۴/۲۵ b	۱/۳±۰/۱۸ b	۱/۳±۰/۳۹ c
گروه ۷(روغن ماهی+ ویتامین Eبعد از زایمان)	۴۷/۶±۲/۲۵ a	۴۳/۱±۱/۷۲ a	۶۳/۳±۴/۲۵ a	۲±۰/۱۸ a	۳±۰/۳۹ a
گروه ۸(روغن ماهی+ ویتامین E قبل و بعد از زایمان)	۴۵/۱±۲/۲۵ a	۳۸/۱±۱/۷۲ b	۵۵/۱±۴/۲۵ b	۱/۴±۰/۱۸ b	۲/۳±۰/۳۹ b

میانگین های با حروف غیر مشابه تفاوت معنی داری با هم دارند(p<۰/۰۵)

در گروه آزمایشی ۵ (ویتامین E بعد از زایمان) ارتفاع اپی تلیوم زایشی و تراکم اسپرماتید (۴/۲۵±۶۱/۱) نسبت به گروه کنترل(۴/۲۵±۴۴/۲) افزایش معنی داری داشت(p<۰/۰۵). در گروه آزمایشی ۷ (روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان) ارتفاع اپی تلیوم زایشی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری پیدا کرده بود. در این گروه تراکم اسپرماتید (۴/۲۵±۶۳/۳) نسبت به گروه کنترل(۴/۲۵±۴۴/۲) افزایش معنی داری را نشان داد(p<۰/۰۵). در گروه آزمایشی

۸ (روغن ماهی و ویتامین E قبل و بعد از زایمان) ارتفاع اپی تلیوم زایشی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود و و واکوئله شدن هم در لوله‌های منی‌ساز مشاهده شد، هم‌چنین تراکم اسپرماتید در این گروه (۴/۲۵±۵۵/۱) نسبت به گروه کنترل(۴/۲۵±۴۴/۲) افزایش معنی داری پیدا کرده بود ($p<۰/۰۵$). تعداد سلول‌های سرتولی در گروه آزمایشی ۵ (ویتامین E بعد از زایمان) ۰/۱۸±۲/۱ و گروه ۷ (روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان) ۰/۱۸±۲ بود که نسبت به گروه کنترل (۰/۱۸±۰/۹) افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین، تعداد سلول‌های لیدیگ در گروه کنترل (۰/۳۹±۱/۷) نسبت به گروه آزمایشی۵ (ویتامین E بعد از زایمان) (۰/۳۹±۳/۹) و گروه ۷ (روغن ماهی و ویتامین E بعد از زایمان) (۰/۳۹±۳) کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$) (شکل ۱).



شکل ۱. مقطع عرضی قسمتی از بافت بیضه: الف:گروه کنترل، ب: گروه آزمایشی ۱، ج: گروه آزمایشی ۲، د: گروه آزمایشی ۳، ه: گروه آزمایشی ٤، گروه آزمایشی ٥، ز: گروه آزمایشی٦، ح: گروه آزمایشی ۷، ط: گروه آزمایشی ۸. سلول اسپرماتوگونی(پیکان A)، سلول اسپرماتوسیت (پیکان B)، سلول اسپرماتید(پیکان C)، سلول سرتولی(پیکان D)، سلول لیدیگ(پیکان E)، بزرگنمایی(X٤٠) رنگ آمیزی H& E

بحث

رژیم غذایی مناسب از جمله مسائل مهمی است که ابعاد مختلف سلامتی از جمله تولید مثل و باروری را تحت الشعاع قرار می‌دهد و به نظر می‌رسد اهمیت این موضوع در مادران باردار و شیرده، دوچندان است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد کمبود یا مقدار اضافی مواد مغذی مانند اسیدهای چرب اثرات مخربی را بر اندام‌های مختلف خواهد داشت. اغلب مطالعات در رابطه با کمبود مکمل‌های غذایی بوده

است، اما مطالعه حاضر به رابطه مصرف مکمل‌های غذایی هم چون روغن ماهی و ویتامین E توسط مادر و تاثیر آن بر بیضه و سلول‌های جنسی در نوزادان نر پرداخته شده است. در این مطالعه مصرف روزانه ۱۰ میکرولیتر روغن ماهی به همراه ویتامین E و نیز ویتامین E به تنهایی در دوران شیردهی، توانست موجب افزایش وزن بدن نوزادان شود. در راستای نتایج مطالعه حاضر، در سال ۲۰۰۵ محققان گزارش کردند که مصرف امگا- ۳ در دوران بارداری انسان موجب افزایش وزن نوزادان در هنگام تولد می‌شود(۱۳). از طرفی گزارش شده است که بین وضعیت تغذیه در سه ماه آخر بارداری و وزن تولد نوزادان ارتباط وجود دارد(۲۹). اخیراً محققین گزارش کردند که اسید چرب مصرفی در نوزادان، به مقدار شیر مصرف شده و مقدار انرژی حاصل از آن وابسته است و اسیدهای چرب موجود در شیر مادر به توسعه سیستم عصبی نوزاد کمک خواهندکرد(۳۰). از طرف دیگر، موسوی و همکاران(۲۰۱۶)گزارش کردندکه رژیم غذایی پر چرب غنی از اسیدهای چرب امگا-۶ و امگا-۹، تعداد نوزادان و مدت زمان بارداری را کاهش می‌دهند. از طرفی امگا-۹ باعث می‌شود جنسیت نوزاد به سمت ماده گرایش پیدا کند(۳۱). هاگارتی در سال۲۰۱۴ اعلام کرد مصرف LCPUFA n-3 (زنجیره بلند اسیدهای چرب اشباع نشده امگا-۳) خطر تولد نوزادان زودرس را کاهش و باعث افزایش طول مدت بارداری و اثرات ثانویه بر وزن تولد می‌شود(۳۲). بنابراین تاکید بر نقش حیاتی امگا-۳ در تغذیه مادر، منطقی به نظر می‌رسد. از طرفی ارتباط مثبت بین مصرف DHA مادر و وزن نوزادان نر و نسبت مصرف اسیدهای چرب امگا-۳ به امگا-۶ و چاقی در نوزادان ماده، نشان می‌دهد که مصرف اسیدهای چرب اشباع نشده زنجیره بلند مادری به شدت بر ترکیبات بدن جنین تاثیر می‌گذارد(۳۵). محققین در سال ۱۹۹۲ گزارش کردند هر چه مقدار مصرف روغن ماهی در رژیم غذایی زنان شیرده بیشتر باشد، مقدار DHA در شیر آن‌ها افزایش می‌یابد(۱۱). در سال ۲۰۱۱ محققان به این نتیجه رسیدند که نوزاد انسان به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به ۵ میلی‌گرم در روز DHA نیاز دارند تا بتوانند هموستازی DHA پلاسما را حفظ کنند. لازم به ذکر است، که سطح DHA خون نوزادان رابطه مستقیمی با سطح DHA در خون و شیر مادر دارد(۱۸). در جدیدترین مطالعه در ایران، محققین دانشگاه تبریز اثرات مثبت مصرف روزانه ۱۰۰۰ میلی‌گرم روغن ماهی/ روز را بر بهبود و تغییر الگوی اسیدهای چرب نوزاد انسان گزارش نموده‌اند، اما در خصوص تغییرات وزن تولد نتیجه‌ای ارائه نکرده بودند(۲۸).کلندینین و همکاران(۲۰۰۵) نشان دادند که سوخت و ساز اسیدهای چرب بلند زنجیر مانند امگا-۳ موجود در روغن ماهی، مقدار چربی‌ها را کاهش داده و به صورت بافت آدیپوز، در افزایش وزن بدن مشارکت می‌کنند(۱۲). در مطالعات گروهی از محققین مشاهده شد که افزودن ۱۸۰ میلی‌گرم EPA و ۱۲۰میلی‌گرم DHA به رژیم غذایی مادران باردار تاثیری در مدت بارداری نداشته اما وزن تولد را کاهش داده است. هم‌چنین، اوکن و همکاران نیز اظهار کردند که EPA و DHA روی مدت بارداری تاثیری ندارد اما با وزن جنین ارتباط معکوس دارند(۱۷). بنابراین، تغییرات وزن بدن نوزادان مطالعه حاضر در مادرانی که روغن ماهی مصرف کرده بودند؛ مطابق مطالعات گذشته بود. هرچند این یافته با توجه به مصرف مکمل روغن ماهی که حاوی انرژی بالایی است، قابل توجیه خواهد بود؛ اما با توجه به مصرف مقادیر اندک این ترکیب در رژیم غذایی به نظر می‌رسد فعالیت این ماده در سطح ژن و افزایش بیان ژن‌های متابولیکی، عامل تغییرات وزن بدن است.

ون گور و همکاران(۲۰۰۹) گزارش کردند که AA(آراشیدونیک اسید) و DHA شیر مادر به طور چشم‌گیری به رژیم غذایی مادر، حساس هستند. به نظر می‌رسد که AA و به ویژه وضعیت DHA مادر با شیردهی مادرکاهش می‌یابد(۳۳). از طرفی تاثیر اسیدهای چرب رژیم غذایی مادر بر شرایط نوزاد در سطح سلولی بهتر نمود خواهد داشت؛ چرا که در سال ۲۰۱۵ محققان گزارش کردند مکمل DHA در دوران بارداری بر روی قد، وزن،BMI در طول ۶۰ ماهگی اول تولد تاثیر نمی‌گذارد(۳۴).

در مطالعه حاضر مادرانی که روغن ماهی به همراه ویتامینE و ویتامین E به تنهایی در دوران شیردهی دریافت کردند، وزن بیضه نوزادان آن‌ها نسبت به نوزادان گروه کنترل افزایش داشت. از آنجا که ویتامین E به صورت رایج به عنوان یک ویتامین ضد ناباروری مطرح است، بنابراین این احتمال وجود دارد که این ویتامین با تاثیر مثبت بر رشد اندام‌های تناسلی از جمله بیضه و هم‌چنین افزایش ضخامت اپلی‌تلیوم زایشی لوله‌های سمینیفر و غشاء پایه، موجب افزایش وزن بیضه شده باشد(۲۵). از طرفی به دلیل محتوای بالای اسید چرب بلند زنجیر، اسپرماتوزوآ مستعد تخریب اکسیداتیو با وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. این آسیب پذیری فزآینده به عنوان مهم‌ترین دلیل ناباروری جنس نر شناخته شده است. هر چند منابع چربی خاص می‌تواند باعث بهبود وضعیت اسیدهای چرب اسپرم شوند؛ اما این سلول‌ها نسبت به تخریب اکسیداتیو حساس‌تر می‌شوند. لذا باید هرگونه افزایش سطح اسیدهای چرب غیر اشباع در رژیم غذایی همراه با افزودن مکمل ویتامین E در خوراک باشد. با از بین رفتن این تعادل و تجمع مقادیر زیاد رادیکال‌های آزاد تخریب وسیع اسیدهای چرب غشاء و اختلال متابولیسم سلول رخمی دهد و ممکن است در بافت اپیدیدیم هم اثرات منفی داشته باشد و اختلال در بلوغ و کیفیت اسپرم را به همراه داشته باشد(۲۶). از طرفی در سال ۱۹۹۹ محققان اعلام کردند کاهش وزن بیضه ممکن است به خاطر کاهش قطر لوله‌های منی ساز، ضخامت اپی تلیال، اندازه بیضه یا افزایش در فضای بین لوله‌ای باشد که در نهایت منجر به تخریب بیضه می‌شود(۱۵). مشاهدات بور در سال ۱۹۳۰ نیز نشان داده بود که رت‌های دچار کمبود اسیدهای چرب ضروری ؛ بیضه‌های کوچک داشته و عقیم بودند(۵). محققان بعد از ۲۱ هفته کمبود اسیدهای چرب ضروری نتایج مشابهی مانند بور به دست آورند(۱۰). از طرفی نتایج حاصل از مطالعات در سال ۲۰۰۰ نیز نشان داد که کاهش وزن بیضه، باعث کاهش اندازه یا طول و عرض بیضه می‌شود که این امر می‌تواند ناشی از لیز شدن سلول‌های لیدیگ، کاهش سلول‌های اسپرم ساز و کاهش اسپرماتوژنز باشد. با لیز شدن سلول‌های لیدیگ، میزان هورمون تستوسترون نیزکاهش می‌یابد(۱۴). نتایج مطالعات در سال ۱۹۷۷ نشان داد که کاهش فسفولیپید در بیضه جانوران که در رژیم غذایی کمبود اسیدهای چرب را داشتند؛ به کاهش عملکرد آن‌ها ارتباط دارد. مانند رت‌ها و خرگوش‌هایی که کمبود چربی داشتند و وزن اندام تولید مثلی ضمیمه در آن‌ها کاهش پیدا کرده بود(۱۶). به نظر می‌رسد که در مطالعه حاضر، جفت و پرده‌های جنینی در طول مدت بارداری اجازه عبور بدون کنترل اسیدهای چرب را نداده‌اند. اما پس از زایمان و مصرف این منابع در رژیم غذایی مادر و انتقال آن‌ها به شیر، به صورت کنترل نشده این منابع به نوزاد منتقل شده است. در همین راستا و با توجه به افزایش وزن بیضه، نسبت وزن بیضه به وزن بدن در نوزادانی که مادران در دوران شیردهی روغن ماهی به همراه ویتامینE و ویتامین E به تنهایی دریافت کردند، نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشت.

لین وهمکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کردند که نسبت اسیدهای چرب n-6/n-3 در گوسفند ،گسترش بیضه و عملکرد گنادهای جنسی را افزایش می‌دهد و کیفیت اسپرم را بهبود می‌بخشد. این تغییرات احتمالاً به هورمون‌های مطلوب متابولیسم و ظرفیت آنتی اکسیدانت، وابسته هستند. یافته‌ها نشان می‌دهد که تعادل نسبت رژیم غذایی قبل از بلوغ جنسی در دام نقش مهمی را ایفا می‌کند و ممکن است برای انسان و گونه‌های دیگر هم قابل تعمیم باشد(۳۶).تیجرینا و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که ریز مغذی‌ها در مادران بر روی بیان ژن گیرنده‌های فعال شده با تکثیر پراکسی زوم :PPAR Y peroxisome proliferator-activated receptors (gamma) در جفت و کبد نوزادان تاثیر بسزایی دارد. PPAR به عنوان پروتئینی است که درگیر سازگاری جنینی به رژیم غذایی مادر می‌شود. آن‌ها بیان ژن‌های کلیدی و اساسی متابولیسم چربی، اکسیداسیون اسید چرب و رشد و نمو را تنظیم می‌کنند و به نظر می‌رسد یکی از دلایل عمده پاسخ‌های مشاهده شده در مطالعه حاضر است. هر چند در مطالعه حاضر این ژن مورد بررسی قرار نگرفته است، اما در مطالعات پیشین

ارتباط تنگاتنگ این اسیدهای چرب و افزایش بیان PPAR گزارش شده بود(۱۹).

افزایش سلول‌های جنسی و مقایسه تغذیه در دوران بارداری و شیردهی با روغن ماهی و ویتامین E، برای اولین بار در این مطالعه گزارش می‌شود. تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید، سرتولی و لیدیگ نوزادان در گروهی که مادران در دوران شیردهی روغن ماهی به همراه ویتامینE و ویتامین E به تنهایی دریافت کردند، نسبت به گروه کنترل افزایش تقریبا دو برابری داشت. در سال۱۹۶۷ آزمایشی روی خرگوش‌های سه ماهه نر انجام شد و نتایج به دست آمده نشان داد که کمبود اسیدهای چرب ضروری با تغذیه ناقص، تغییرات چشم‌گیری در لوله‌های منی ساز ایجاد کردند. در نتیجه این تغییرات، اسپرماتوژنز بعد از مرحله اسپرماتوسیت‌های ثانویه متوقف شد و لوله‌های منی ساز کوچک‌تر از گروه کنترل بودند. تغییری در تعداد یا اندازه سلول‌های بینابینی(سلول‌های لیدیگ) دیده نشد. اسپرماتوگونی‌ها و اسپرماتوسیت‌های اولیه اندازه و شکل طبیعی داشتند. وزن اندام‌های تولیدمثلی ضمیمه در خرگوش‌هایی که کمبود اسیدهای چرب داشتند کم بود و دلیل دیگر این بود که تحلیل غدد جنسی در طول مدت کمبود اسید چرب ضروری، می‌تواند به دلیل آسیب اولیه هیپوفیز قدامی هم باشد. بدیهی است روغن ماهی، که غنی از DHA و EPA است و فاکتورهای خیلی موثری برای تغییر محتوی DHA بیضه‌ها دارد و می‌تواند مکانیسمی برای درک نقش آن در بلوغ و اسپرماتوژنز، فراهم کند(۲۰).

بخشی از پاسخ‌های مشاهده شده به دلیل نقش کلیدی اسیدهای چرب امگا-۳ و ویتامین E در متابولیسم هورمون‌ها مطرح می‌شود. در سال ۲۰۰۶ محققان گزارش کردند که آراشیدونیک اسید(AA: Arachidonic acid) و متابولیت‌های آن از طریق تاثیر مستقیم روی استروئیدوژنز (برای مثال پروتئین تنظیم‌کننده حاد استروئید(STAR P: steroidogenic acute regulatory protein)، پپتید۱ به صورت غیرمستقیم توسط پروستاگلاندین ها در اسپرماتوژنز نقش دارند(۲۱). در سال ۲۰۱۵ محققان اعلام کردند که سلول‌های اسپرم(موش) با افزایش سطح رقابت و افزایش سطح اسیدهای چرب اشباع شده (مقاوم به پراکسیداسیون لیپیدها) و با کاهش نسبت PUFA ها ارتباط دارد. (۳۷).

محققان با اضافه کردن روغن ماهی به جیره غذایی گوسفند اعلام کردند که روغن ماهی روی بهبود کیفیت اسپرم تاثیر می‌گذارد و مرگ اسپرم را کاهش دهد(۲۲). انتظار می‌رود سلول‌های سرتولی در فراهم کردن DHA برای تمایز اسپرماتوژنز شرکت داشته باشند(۲۳). در سال ۱۹۷۸ محققین گزارش کردند که سلول‌های سرتولی اولین نوع سلولی است که تحت تاثیر کمبود قرار می‌گیرد و به همین دلیل می‌تواند هدف اولیه در کمبود اسیدهای چرب ضروری و منتهی به عقیمی نر باشد. یکی از مکانیسم‌های احتمالی برای تاثیر کمبود اسیدهای چرب بر سلول‌های سرتولی ارتباط آن‌ها با آندروژن است. به عبارت بهتر، اسیدهای چرب با تغییر غلظت تستسترون اثر خود را بر سلول سرتولی نشان می‌دهند(۱۰). مطالعات سبوکوواو همکاران در سال ۱۹۸۷ نشان داد که تغییر چربی جیره غذایی موش، پاسخ‌گویی سلول‌های لیدیگ را تغییر می‌دهد؛ زیرا فعالیت آدینیلات سیکلاز تحریک شده با هورمون لوتئینی(LH :Luteinizing hormone) و سنتز تستوسترون تغییر می‌کند. تغییر ترکیب لیپیدی غشای پلاسمایی توسط رژیم غذایی روی دسترس‌پذیری رسپتورهای : human chorionic :گنادوتروپین LH/hCG تاثیردارد. به طوری که افزایش تعداد سلول‌های لیدیگ به عنوان سلولی که هورمون تستوسترون در پاسخ به هورمون لوتئینه کننده ترشح می کند، می‌تواند توجیه کننده تغییرات ایجاد شده در بافت بیضه و افزایش روند اسپرماتوژنزیز شود(۲۴).

نتیجه‌گیری

امروزه مصرف روغن ماهی در مادران باردار از جمله توصیه‌های رایج است. نتایج مطالعه حاضر بر تاثیر این مکمل بر اندام تولیدمثلی فرزندان مذکر تاکید دارد. تغذیه روغن ماهی به همراه ویتامین E و ویتامینE به تنهایی، توسط

مادران در دوران شیردهی در مقایسه با دوران بارداری، باعث افزایش تعداد سلول‌های جنسی نوزادان نر در موش شد. از آنجا که پژوهش حاضر اولین مطالعه در رابطه با استفاده از روغن ماهی در تغذیه مادری و تاثیر آن بر اندام جنسی نر است؛ مسلماً جهت کاربرد کلینیکی آن نیاز به مطالعات عمیق و بیشتر است. مقایسه نقش کلیدی جفت و پستان، بررسی انتقال انتخابی، مصرف سطوح مختلف روغن ماهی در رژیم غذایی مادران شیرده یا باردار برای تکمیل نتایج پیشنهاد شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بر اساس طرح مشترک پژوهشی، بین پژوهشگاه رویان تهران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند با کد طرح ۹۱۰۰۰۲۷۶ و نیز مجوز کمیته اخلاق پژوهشگاه رویان انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از کمک‌های ارزشمند آقای وحید اسماعیلی، آقای ابوالفضل خیمه، آقای دکتر محمد چهرازی و آقای مصطفی نجار در اجرای این پژوهش تشکر و سپاسگزاری نمایند.

منابع

1. Barker, D.J. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. Br. Med. Bull 1997; 53(1);96-108 .
2. Alizadeh AR, Alikhani M, Ghorbani GR, Rahmani HR , Rashidi L, Loor J.J. Effects of feeding roasted safflower seeds (variety IL-111) and fish oil on dry matter intake,performance and milk fatty acid profiles in dairy cattle. J Anim Physiol Anim Nutr(Berl). 2012; 96(3): 466-473.
3. Wathes DC, Abayasekara D.R.E & Aitken R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. Bio Reprod. 2007; 77, 190–201.
4. Esmaeili V, Shahverdi AH, Moghadasian MH, Alizadeh A. R. Dietary fatty acids affect semen quality: a review. Andrology. 2015; 3, 450–461.
5. Burr GO , Burr M .On of the nature and role of the fatty acids essential in nutrition . J. Biol. Chem. 1930; 86:587.
6. Youdim KA, Martin A, Joseph J.M. Essential fatty acid and the brain : possible health implications. International journal of developmental neuroscience. 2000;18:384-399.
7. Saether T, Tran TN, Rootwelt H, Grav HJ, Christophersen BO, Haugen T.B. Essential fatty acid deficiency induces fatty acid desaturase expression in rat epididymis, but not in testis. Reproduction 2007;133(2):467-77
8. Ramakrishnan U, Imhoff-Kunsch B, DiGirolamo A.M. Role of docosahexaenoic acid in maternal and child mental health. The American journal of clinical nutrition 2009; 89(3):958s-62s.
9. Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. Theriogenology. 200515;63(2):411-21.
10.Hildebrandt-Stark HE, Fawcett D.W. Effects of Deficiency of Essential Fatty Acid and Treatment with Prostoglandin E2 on the Ultrastructure Rat Testis .Biology of Reproduction 1978; 19.736-746.
11. Henderson RA, Jensen R, Lammi-Keefe CJ, Ferris AM, Dardick K.R. Effect of fish oil on the fatty acid composition of human milk and maternal and infant erythrocytes. Lipids 1992; 27:863–9.
12. Clandinin MT, van Aerde JE, Merkel KL, Harris CL ,Springer M.A. Hansen J.W. et al. rowth and development of preterm infants fed infant formulas con-taining docosahexaenoic acid and arachidonic acid. J Pediatr 2005 ;146, 461–468.
13. Thorsdottir I , Tomasson H , Gunnarsdottir I, Gisladottir E, Kiely M , Parra M.D, et al. Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. International journal of obesity 2005 ;31(10):1560-6.

14. Debnath D and Mandal T.K. Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E.C.)-induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in Sprague-Dawley albino rats. J Appl Toxicol 2000 ;20(3): 197-20.
15. de Jager C, Bornman M.S, vander Horst G. The ffect of p-nonylphenol, an environmental toxicant ewith oestrogenic properties, on fertility potential in adult male rats. Andrologia 1999 ;31(2):99-106.
16. Kholkute S.D.Effect of Hibiscus rosa sinensis on spermatogenesis and accessory reproductive organs in rats. Planta Med 1977 ; Feb;31(2):127-35.
17. Cleland LG, James MJ , Proudman S.M. Fish oil: what the prescriber needs to know. Arthritis Research & Therapy 2006, 8:202 (doi:10.1186/ar1876)
18. Lauritzen L, Carlson S.E. Maternal fatty acid status during pregnancy and lactation and relation to newborn and infant status. Matern Child Nutr 2011;7 Suppl 2:41-58.
19. Tijerina-Sáenz A, Innis SM , Kitts D.D. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. Acta Pædiatrica 2009 ; 98, pp. 1793–1798.
20. Hluwalia B , Pincus G , Holman R.T. Essential fatty acid deficiency and its effects upon reproductive organs of male rabbits. The Journal of nutrition 1967 ;92(2):205-14.
21. Agarwal A ,Bedaiwy MA , Banerjee J, Alvarez J.G.Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting .Fertil Steril 2006 ; Sep;86(3):503-12.
22. Matini Behzad A , Ebrahimi B , Alizadeh AR, Esmaeili V , Dalman A, Rashki l, et al. Improvement in in vitro fertilization rate, decrease in reactive oxygen species and spermatozoa death incidence in rams by dietary fish oil. Reprod Domest Anim 2014; 49, 599–605.
23. Moore S.A ,Yoder E , Murphy S, Dutton GR ,Spector A.A. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 omega-3) and arachidonic acid (20:4 omega-6).
. j .Neurochem 1991;56,518-524.
24. Sebokova E, Garg ML, Wierzbicki A, Thomson AB, Clandinin M.T. Alteration of the lipid composition of rat testicular plasma membranes by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of Leydig cells and testosterone synthesis. The Journal of nutrition 1990 ;120(6):610-8.
25. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. " J Cell Sci 1081995 ;108 (Pt 5):2017-2025.
26. Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neill JD, editors. The physiology of reproduction. New York: Raven Press 1988; p. 999-1080.
27. Jia, X, Pakseresht M, Wattar N, Wildgrube J, Sontag S, Andrews M, et al. Women who take n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplements during pregnancy and lactation meet the recommended intake. Appl Physiol Nutr Metab 2015; May;40(5):474-81.
28. Farshbaf-Khalili A. P. S, Mohamad-Alizadeh S, Darabi M , Hematzadeh S, Mehdizadeh A, Shaaker M, Ostadrahimi A. The effect of fish oil supplementation on serum phospholipid fatty acids profile during pregnancy: A double blind randomized controlled trial. Women Health 2016 ; Mar 24:1-17.
29. Delvarian-zadeh, M, Bolbol Haghighi N, Ebrahimi H. The relationship between nutritional status of mothers in their third trimester and delivery of low birth weight infants. Arak Medical University Journal.
30. Innis S.M. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological

development of infants. Am J Clin Nutr. 2014 Mar;99(3):734S-41S .
31. Mousavi SN, Koohdani F, Shidfar F, Shafiei-Neek L. Effects of Diets Enriched in Omega-9 or Omega-6 Fatty Acids on Reproductive Process. J Family Reprod Health. 2016 Jun;10(2):85-91.
32. Haggarty P. Meeting the fetal requirement for polyunsaturated fatty acids in pregnancy. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2014 Mar;17(2):151-5.
33. van Goor SA, Dijck-Brouwer DA, Hadders-Algra M, Doornbos B, Erwich JJ, Schaafsma A, et al. Human milk arachidonic acid and docosahexaenoic acid contents increase following supplementationduring pregnancy and lactation. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2009 Jan;80(1):65-9.
34. Gonzalez-Casanova I , Stein AD, Hao W, Garcia-Feregrino R, Barraza-Villarreal A, Romieu I,Rivera JA,et al.Prenatal Supplementation with Docosahexaenoic Acid Has No Effect on Growth through 60 Months of Age J Nutr. 2015 Jun;145(6):1330-4. doi: 10.3945/jn.
35. Pereira-da-Silva L , Cabo C, Moreira AC, Papoila AL , Virella D, Neves R, et al. The effect of longchain polyunsaturated fatty acids intake during pregnancy on adiposity of healthy full-term offspring at birth. J Perinatol. 2015 Mar;35(3):177-80 .
36. Lin Y, Cheng X, Mao J, Wu D, Ren B, Xu SY, et al. Effects of different dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios on boar reproduction. Lipids Health Dis. 2016 Feb 16;15:31
37. delBarco-Trillo J , Mateo R, Roldan, ER. Differences in the fatty acid composition of Rodent spermatozoa are associated to levels of sper mcompetition.Biol Open.2015 Mar 20;4(4):466-73
38. Jacometo CB, Osorio JS, Socha M, Corrêa MN, Piccioli-Cappelli F, Trevisi E,et al. Maternal consumption of organic trace mine rals alters calf systemic and neutrophil mRNA and microRNA indicators of inflammation and oxidative stress. J Dairy Sci. 2015 Nov;98(11):7717-29.
39. Pietrantoni E, Del Chierico F, Rigon G, Vernocchi P, Salvatori G, Manco M,et al. Docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy: a potential tool to prevent membrane rupture and preterm labor. International journal of molecular sciences. 2014;15(5):8024-36.
40. Min Y, Djahanbakhch O, Hutchinson J, Bhullar AS, Raveendran M, Hallot A, et al. Effect of docosahexaenoic acid-enriched fish oil supplementation in pregnant women with Type 2 diabetes on membrane fatty acids and fetal body composition-double-blinded randomized placebo-controlled trial. Diabet Med. 2014.
41. Michaelsen KF, Dewey KG, Perez-Exposito AB, Nurhasan M, Lauritzen L, Roos N. Food sources and intake of n-6 and n-3 fatty acids in low-income countries with emphasis on infants, young children (6-24 months), and pregnant and lactating women. Matern Child Nutr. 2011;7 Suppl 2:124-40.
42. Roqueta-Rivera M, Abbott TL, Sivaguru M, Hess RA, Nakamura M.T. Deficiency in the omega-3 fatty acid pathway results in failure of acrosome biogenesis in mice. Biology of reproduction. 2011;85(4):721-32.
43. Castellini C, Lattaioli P, Dal Bosco A, Minelli A, Mugnai C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. Reprod Nutr Dev. 2003;43(1):91-103.