Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷

بررسی تاثیر حمایتی عصاره‌ی اتانولی چای کوهی (*Stachys lavandulifolia*Vahl.) بر روی تخریب بیضه‌ای القا شده با اتانول در رت نژاد ویستار

سیامک یاری Ph.D.[1*]، رویا کرمیان Ph.D.[1]، امیرحسین اسدبگی B.Sc.[2]، مصطفی اسدبگی Ph.D.[1]، مجید رجبی Ph.D.[3]

۱- دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، تهران، ایران.
۲-دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پرستاری ملایر،گروه پرستاری، همدان، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، دانشکده علوم،گروه زیست شناسی، تهران، ایران.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: yarisiamak@yahoo.com،s.yari@basu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲۳

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات حفاظتی چای کوهی بر تخریب القا شده با اتانول می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۴ رت ویستار نر به ۴ گروه مساوی شامل: کنترل، اتانول ($5\ g.\ kg^{-1}$)، اتانول+ عصاره ($500\ mg.\ kg^{-1}$) و عصاره تنها ($500\ mg.\ kg^{-1}$) تقسیم شد. بعد از تیمار به‌مدت ۴ هفته، میانگین قطر لوله‌های سمی‌نیفر (MSTD) و رتبه‌بندی آسیب بافتی جانسون جهت ارزیابی هیستولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این پارامترهای اسپرمی شامل: شمارش اسپرم و تحرک مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان دادند که افزودن اتانول منجر به کاهش معنی‌داری در شمارش اسپرم، تحرک و بقای اسپرم‌ها در گروه اتانول شد. درحالی‌که عصاره مورد مطالعه مانع از این کاهش معنی‌دار این پارامترها در گروه اتانول+عصاره شد. در این مطالعه، میزان MSTD و MTBS در رت‌های تیمار شده با اتانول کاهش یافت. افزودن اتانول هم‌زمان با عصاره منجر به افزایش هر دو مورد ذکر شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه‌ی نشان داد که تیمار با عصاره چای کوهی می‌تواند مسمومیت تولیدمثلی ایجاد شده توسط اتانول را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: اتانول، چای کوهی، بیضه، رت

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مصرف مزمن الکل با نقص درسیستم تولیدمثلی نر همراه است. این نقصان با کاهش تمایل جنسی، آتروفی بیضه‌ای و ناتوانی جنسی مشخص می‌شود. عوامل موثر در ایجاد و شکل‌گیری تخریب‌های بیضه‌ای وابسته به الکل به روشنی مشخص نشده است (۱). در سال‌های گذشته اعتقاد بر این بود که ناباروی و ناتوانی جنسی ایجاد شده در افراد الکلی، از علائم ثانویه‌ی آسیب کبدی ناشی از مصرف الکل می‌باشد (اختلال در استروئیدوژنز کبدی). از سوی دیگر شواهد نشان داده است که نقص در سیستم تولیدمثلی افراد الکلی، در بسیاری از موارد مستقل از عوارض کبدی می‌باشد (۲). مطالعات نشان داده است که متابولیسم اتانول (که به‌طور عمده درکبد صورت می‌گیرد) منجر به تولید متابولیت‌های سمی می‌شود که از مهم‌ترین این متابولیت‌های سمی می‌توان به استالدهید اشاره کرد که در نتیجه‌ی فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز (alcohol dehydrogenase =ADH) تولید می‌شود. این متابولیت می‌تواند منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول‌ها گردد و با اختلال در ساختار لیپیدهای غشایی منجر به آسیب سلولی و در نهایت مرگ سلولی شود (۳). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که آنزیم الکل دهیدروژناز علاوه بر بافت کبد در سلول‌های واقع در بافت بینابینی بیضه نیز بیان می‌شود (۴ و ۵) لذا با افزایش متابولیسم اتانول در داخل خود بیضه‌ها، میزان متابولیت‌های سمی مانند استالدهید افزایش می‌یابد و در نتیجه باعث افزایش مرگ سلولی در سلول‌های بینابینی (لایدیگ) شده و منجر به کاهش میزان تستوسترون می‌شود (۶). از اینجا می‌توان گفت که مصرف اتانول می‌تواند از طریق افزایش متابولیت‌های سمی و رادیکال‌های آزاد و با کاهش دادن سطح آنتی‌اکسیدانت‌های درون‌زا منجر به آسیب بافت‌های تولیدمثلی می‌شود (۷).

گونه‌ی گیاهی SL، متعلق به خانواده‌ی نعناعیان (Labiaceae) می‌باشد. این خانواده یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهان گل‌دار می‌باشند. این خانواده شامل ۲۵۸ جنس و ۷۰۰۰ گونه‌ی گیاهی می‌باشد که پراکندگی جهانی دارند. جنس Stachys یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های متعلق به خانواده‌ی لامیاسه می‌باشدکه شامل ۳۰۰ گونه‌ی گیاهی می‌باشد. در حدود ۳۹ گونه از این جنس در مناطق مختلف کشور ایران رویش دارند (۸). گونه‌ی SL یک گیاه بومی ایران است و در مناطق مختلف جغرافیایی ایران پراکنده است. از این گیاه در طب سنتی در برطرف کردن اختلالات گوارشی، به‌عنوان اشتهاآور، ادرار آور و همچنین به‌عنوان تسکین درد استفاده می‌شود (۹). این گیاه در مناطق مختلف با نام چای کوهی شناخته می‌شود. مشاهدات آزمایشگاهی نشان داده است که این گیاه دارای خواص آرام‌بخش (۱۰)، ضد افسردگی (۱۱)، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانتی (۸)، ضد دردی و ضد التهابی (۱۲) می‌باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که این گیاه در بهبود علایم قاعدگی دردناک نقش مثبتی دارد و احتمالا این ویژگی گیاه به‌واسطه‌ی خواص ضد اسپاسمی آن می‌باشد (۱۳، ۱۴). البته می‌توان گفت که مصرف این گیاه در دوران بارداری می‌تواند دارای عوارض سقط جنین باشد که این عارضه نیز با خواص ضد اسپاسمی آن در ارتباط است (۱۵). بررسی‌های فیتوشیمیایی نشان می‌دهد عصاره گونه مورد مطالعه دارای دو گلیکوزید ایریدوئیدی و یک گلیکوزید فلاونوئیدی و یک گلیکوزید فنیل اتانوئیدی است و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی قابل توجه عصاره گونه مورد مطالعه، موید وجود ترکیبات گلیکوزیله فنولی در آن است (۱۶).

با توجه به خواص فارماکولوژیکی و کاربرد این گیاه در طب سنتی و همچنین وجود ترکیبات زیستی فعال از نظر بیولوژیکی، هدف از این مطالعه بررسی تاثیر حمایتی عصاره‌ی آبی-اتانولی این گیاه بر روی تخریب بیضه‌ای القا شده با اتانول می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: همه مواد شیمیایی و حلال‌های مورد استفاده در این پژوهش ازشرکت مرک (آلمان) و سیگما (آمریکا) با درصدخلوص بالا تهیه شده است.

مواد گیاهی: گونه *S. lavandulifolia* از زیستگاه طبیعی خود در استان همدان جمع آوری شد و نمونه در هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا (BASU) نگه‌داری شد.

استخراج عصاره گیاهی: برای تهیه عصاره، ۲۵ گرم از اندام‌های هوایی گونه مورد مطالعه پودر شد. استخراج عصاره از پودر خشک گیاه با ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و توسط دستگاه سوکسله به‌مدت ۶ ساعت انجام شد. عصاره پس از صاف کردن توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ تا زمان مصرف در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگه‌داری شد.

حیوانات آزمایشگاهی و گروه‌بندی آن‌ها: در این پژوهش، حیوانات (رَت نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم) در شرایط استاندارد از نظر شرایط نگه‌داری (آب و غذا، دوره روشنایی-تاریکی، دما و رطوبت) نگه‌داری شدند. موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی که مورد تایید کمیته اخلاق گروه زیست‌شناسی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان بود، هنگام کار با رت‌ها رعایت شد. در این مطالعه، ۲۴ رت ویستار نر به ۴ گروه مساوی شامل: کنترل، اتانول ($5\ g.\ kg^{-1}$)، اتانول($5\ g.\ kg^{-1}$) + عصاره- ($500\ mg.\ kg^{-1}$) و عصاره تنها ($500\ mg.\ kg^{-1}$) تقسیم شد. تیمار عصاره و اتانول به‌صورت روزانه و به‌روش دهانی (درون معده‌ایی) انجام شد حجم عصاره تیماری حدود یک میلی لیتر و یک‌بار در روز و در مورد اتانول دوبار در روز و هر بار یک و نیم میلی‌لیتر الکل ۴۰ درصد بود و طول کل دوره‌ی تیمار ۴ هفته بود. پس از طی شدن دوره مطالعه (۲۸ روز)، حیوانات با تنفس دوز بالای اتر کشته شدند. بیضه‌ها بلافاصله از بدن حیوان خارج شدند و توزین شدند وزن نسبی بیضه‌ها از تقسیم وزن بیضه‌ها به وزن رت‌های مورد مطالعه و ضرب عدد حاصله در ۱۰۰ محاسبه شود پس از محاسبه‌ی وزن نسبی بیضه-ها در هر گروه، بیضه‌ها پس از شستشو، جهت مطالعات بافت‌شناسی در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند.

آنالیز بافت‌شناسی بافت بیضه: جهت مطالعه بافت‌شناسی، بیضه‌ها جدا شده و با استفاده از سرم فیزیولوژیکی شستشو و سپس در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت بیضه‌ها با درجات صعودی اتانول، آب‌گیری و توسط پارافین قالب‌گیری شدند. نمونه‌های قالب‌گیری شده با پارافین توسط میکروتوم روتاری با ضخامت ۵ میکرومتر برش‌گیری و با رنگ هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. برش‌های رنگ‌آمیزی شده توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و از آن‌ها عکس‌برداری شد. با استفاده از نرم افزار تحلیل تصاویر Image J قطر لوله‌های سمی‌نیفر اندازه‌گیری شد تا برای مقایسه‌ی میانگین قطر لوله‌های سمی‌نیفر (Mean seminiferous tubules diameters=MSTD) در گروه‌های تیماری مختلف مورد استفاده قرار گیرد. در ادامه رتبه بندی جانسون (Mean testicular biopsy score=MTBS) جهت ارزیابی میزان آسیب بافت بیضه و اسپرماتوژنز در گروه‌های مختلف تیماری صورت گرفت (۱۷). برای این منظور، رتبه ۱ تا ۱۰ (شکل ۱) به‌هر یک از لوله‌های سمی‌نیفر مورد ارزیابی، تعلق گرفت. جهت ارزیابی MSTD و MTBS، تعداد ۱۰۰ لوله‌ی سمی‌نیفر به‌صورت تصادفی در نواحی مختلف هر یک از اسلایدهای مورد مطالعه، ارزیابی شد.

ارزیابی پارامترهای اسپرم اپی‌دیدیمی: برای ارزیابی پارامترهای اسپرمی، ناحیه‌ی دمی اپی‌دیدیم متعلق به‌هر یک از گروه‌های تیماری جدا شده و در پتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM همراه با آلبومین سرم گاو (Bovine Serum Albomine =BSA)، به قطعات به اندازه تقریبی ۲ میلی‌متر تبدیل شد. سپس به‌مدت چند دقیقه و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط مرطوب نگه‌داری شدند تا اسپرم‌ها به‌داخل محیط مایع وارد شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

توضیح	رتبه
بدون سلول	۱
وجود سلول‌های سرتولی، عدم وجودسلول‌های زایا	۲
وجود اسپرماتوگونی	۳
تعداد کمی اسپرماتوسیت	۴
تعداد زیادی اسپرماتوسیت	۵
تعداد بسیارکم اسپرماتید	۶
تعداد زیادی اسپرماتیداولیه	۷
تعداد کم اسپرماتید نهایی	۸
تعداد زیادا سپرماتید نهایی	۹
اسپرماتوژنزیس کامل	۱۰

شکل ۱: رتبه‌بندی جانسون. میانگین آسیب بیضه‌ای (MTBS)

در ادامه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرمی برداشته و به لام هماسیتومتر منتقل شد و شمارش اسپرم‌ها صورت گرفت. شمارش اسپرم‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰۰x صورت گرفت (۱۸).

بقای اسپرم‌های اپی‌دیدیمی با استفاده از محلول ۵ درصد رنگ ائوزین Y صورت گرفت. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرمی را بر روی لام قرار داده و با مقدار مساوی از محلول رنگ ائوزین مخلوط شد و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی x ۴۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. اسپرم‌های زنده بی‌رنگ و اسپرم‌های مرده صورتی رنگ مشاهده شدند (۱۹).

ارزیابی تحرک اسپرم‌ها بر اساس معیار تحرک یا عدم تحرک صورت گرفت (۲۰). برای این منظور ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرمی را برداشته و در لام شیشه‌ای قرار داده و تعداد اسپرم‌های متحرک و غیر متحرک شمارش شدند. به‌طور تقریبی ۲۰۰ عدد اسپرم مورد شمارش قرار گرفتند و درصد اسپرم‌های متحرک محاسبه شد.

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست آمده از سنجش میزان اوره و کراتی‌نین و همچنین وزن نسبی کلیه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و با روش Tukey's post hoc مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج با استفاده از نرم‌افزار Excell رسم شد.

نتایج

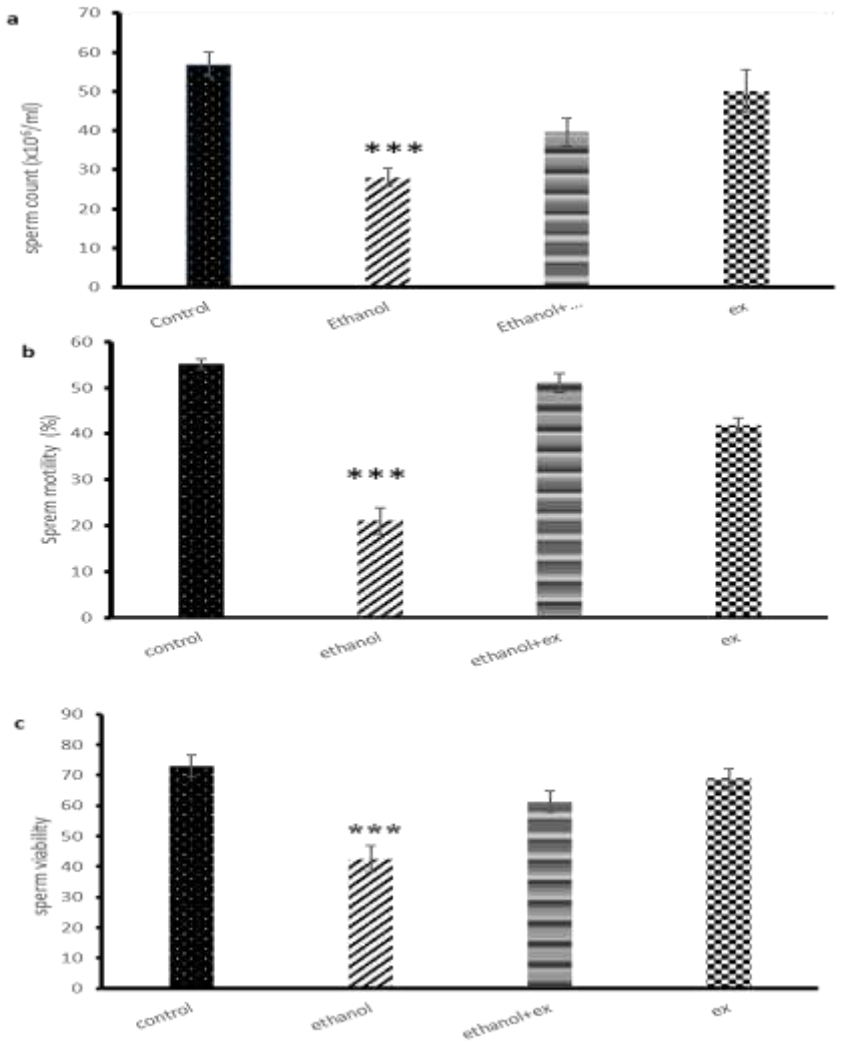
بررسی تغییرات پارامترهای اسپرم اپی‌دیدیمی در گروه‌های مختلف

همانطوری‌که در شکل 2a مشاهده می‌شود تعداد اسپرم‌های در رت‌های تیمار شده با اتانول ($5mg/kg^{-1}$) به‌شکل معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p<0.001$). در حالی که در گروه تیمار با عصاره‌ی با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن و اتانول به‌طور هم‌زمان، تعداد اسپرم‌ها به میزان زیادی افزایش داد و مقدار آن را به‌مقدار گروه کنترل نزدیک شد. تیمار با عصاره‌ی تنهای چای کوهی با دوز۵۰۰ میلی‌گرم به‌ازای

www.SID.ir

Archive of SID

هر کیلوگرم وزن بدن کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد.

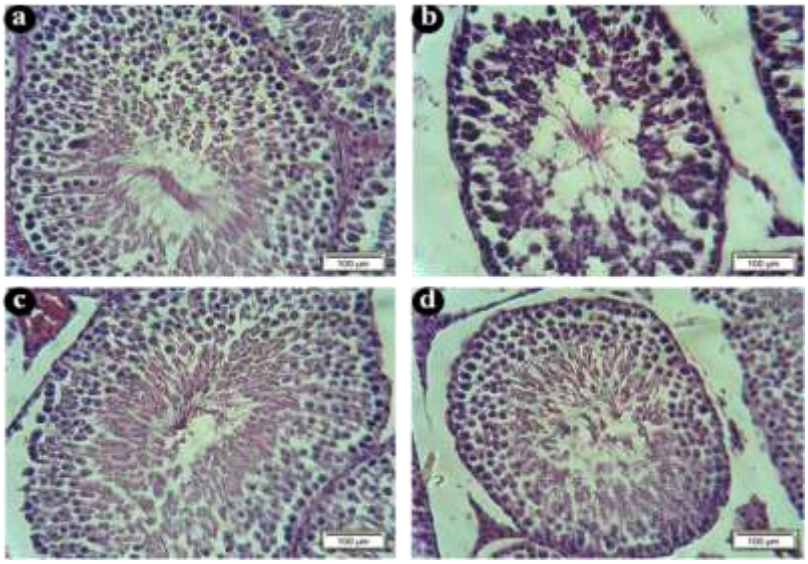


شکل ۲: a) تغییرات تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف تیماری. گروه کنترل (control)، گروه اتانول (ethanol)، گروه اتانول +عصاره (ethanol+ex) و گروه عصاره‌ی تنها (ex)، b) تغییرات بقای اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف تیماری. گروه کنترل (control)، گروه اتانول (ethanol)، گروه اتانول +عصاره (ethanol+ex) و گروه عصاره‌ی تنها (ex)، c) تغییرات تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های مختلف تیماری. گروه کنترل (control)، گروه اتانول (ethanol)، گروه اتانول +عصاره (ethanol+ex) و گروه عصاره‌ی تنها (ex)، در تمامی موارد گروه اتانول با $p<0.001$ (***) نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

در شکل ۲c تغییرات میزان بقای اسپرم در گروه‌های مختلف تیماری به نمایش گذاشته‌شده است همانطوری‌که در شکل مشاهده می‌شود روند تغییرات بقای اسپرم اپی‌دیدیمی مشابه با روند تغییرات تعداد اسپرم‌ها می‌باشد و درصد بقای اسپرم اپی‌دیدیمی در رَت‌های تیمار شده با اتانول به‌میزان معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است و تیمار با عصاره چای کوهی توانسته است این روند کاهشی را در رت‌های تیمار شده با اتانول ممانعت کرده و میزان بقای اسپرم‌ها در این گروه نیز نزدیک به گروه کنترل می‌باشد. مصرف عصاره تنها در این مورد نیز تاثیر قابل توجهی در بقای اسپرم‌ها برجای نگذاشته و نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نمی‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: تصاویر برش‌های لوله سمی‌نیفر بیضه در گروه‌های مختلف. a) گروه کنترل، b) گروه اتانول، c) گروه اتانول +عصاره و d) گروه عصاره‌ی تنها. تمامی تصاویر بزرگنمایی ۴۰۰x دارند.

در شکل ۲b میزان تحرک اسپرم‌های اپی‌دیدیمی در گروه‌های مختلف تیماری نشان داده شده است. در مورد این پارامتر اسپرمی نیز تغییرات مشاهده شده در گروه‌های مختلف تیماری مشابه میزان بقا و تعداد اسپرم‌ها می‌باشد.

بررسی‌های هیستولوژیکی بیضه‌های گروه‌های مختلف بررسی تصاویر برش‌های بافتی گروه‌های مختلف تیماری با استفاده از میکروسکوپ نوری، نشان داد که در گروه کنترل و همچنین گروه تیمار با عصاره تنها شاهد نظم طبیعی در اپی‌تلیوم لوله‌های سمی‌نیفر هستیم.

همچنین قطر این لوله‌ها نیز در این دو گروه طبیعی بوده و تقریبا گرد و سلول‌های موجود در اپی‌تلیوم لوله‌ها آرایش طبیعی خود را حفظ کرده‌اند (شکل ۳، a و d). همان‌طوری‌که در شکل ۳b مشاهده می‌شود ساختار منظم و آرایش طبیعی سلول‌های موجود در لوله‌های سمی‌نیفر متعلق به گروه تیمار با اتانول به‌شدت به‌هم ریخته و لوله‌ها از شکل طبیعی گرد خود خارج شده اند. همچنین ضخامت اپی‌تلیوم این لوله‌ها کاهش یافته است. حفرات زیادی در اپی‌تلیوم این لوله‌ها مشاهده می‌شود که ناشی از نکروز شدید سلول‌های واقع در اپی‌تلیوم می‌باشد. در صورتی که در برش‌های مربوط به گروه اتانول+ عصاره، ساختار طبیعی لوله‌ها حفظ شده است و شاخص‌های پاتولوژیکی مشاهده شده در گروه اتانول مشهود نیست و لوله‌های سمی‌نیفر در این گروه نمایی مشابه با گروه کنترل را به نمایش می‌گذارند. علاوه بر این همان‌طوری‌که در شکل ۴ مشاهده می‌شود شاخص‌های MTBS و MSTD نیز در گروه اتانول به شکل معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. ولی تیمار هم‌زمان عصاره‌ی چای‌کوهی و اتانول توانست این دو شاخص را به‌شکل معنی‌داری نسبت به گروه اتانول، افزایش دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

شاخص مورد بررسی	کنترل	اتانول	اتانول + عصاره	عصاره
MSTD (µm)	۲۵۵/۱۶±۶/۰۲[a]	۱۸۹/۳۴±۷/۴۲[b]	۲۴۵/۳۵±۸/۳۳[a]	۲۴۸/۴۴±۵/۱۱[a]
MTBS	۹/۷۰±۰/۵۳[a]	۶/۱۳±۰/۲۶[b]	۸/۳۸±۰/۵۴[a]	۸/۹۳±۰/۶۴[a]

شکل ۴: میانگین قطر توبول‌های سمی‌نیفر(MSTD) و میانگین رتبه‌ی آسیب بیضه‌ایی (MTBS)، مقادیر، میانگین۳تکرار SD ± است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ است. گروه اتانول در هر دو معیار اندازه‌گیری شده نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است.

بحث

مصرف اتانول تاثیرات مختلفی بر سیستم تولیدمثلی می‌گذارد که این تاثیرات از جنبه‌های مختلف هورمونی و هیستولوژیکی قابل بررسی می‌باشد. تاثیرات مخرب مصرف اتانول به‌واسطه افزایش رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط متابولیسم اتانول می‌باشد. لذا یکی از روش‌های مواجهه با اثرات سو مصرف اتانول استفاده از مکمل‌های با منشا طبیعی و به‌خصوص ترکیبات گیاهی می‌باشد. این ترکیبات گیاهی محتوی ترکیبات مختلف آنتی‌اکسیدانتی هستند و می‌توانند با روبش رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط اتانول، از اندام‌های مختلف در برابر اثرات مخرب استرس اکسیداتیو تولید شده مقابله کنند.

در این مطالعه، اثرات حمایتی عصاره هیدرواتانولی گیاه چای‌کوهی بر آسیب بافتی القا شده با اتانول مورد بررسی قرار گرفت همچنین پارامترهای اسپرمی نیز به‌عنوان یک شاخص مهم کارکرد صحیح سیستم تولید مثلی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مکانسیمی که از طریق آن اتانول بر پارامترهای اسپرمی اثر می‌گذارد به درستی روشن نیست. نتایج این مطالعه نشان داد که تمامی پارامترهای اسپرمی مطالعه شده در نتیجه‌ی مصرف اتانول کاهش می‌یابد. مطالعات قبلی نشان می‌دهند که سطح استرس اکسیداتیو وتولید ROS به هنگام مصرف اتانول افزایش می‌یابد (۲۱). این موضوع نشان می‌دهد که افزایش ROS ها احتمالا عامل کاهش پارامترهای مطالعه شده در این پژوهش می‌باشد.

در گروه تیمار با اتانول، همان‌طوری‌که در شکل 3b مشاهده می‌شود، واکوئله شدن شدید در اپی‌تلیوم لوله‌های سمی‌نیفر مشهود است. رتبه‌بندی بافتی براساس روش جانسون (۱۴) یکی از روش‌های بررسی اسپرماتوژنز براساس یافته‌های بافتی می‌باشد (شکل ۱). استفاده از این روش رتبه‌بندی، میزان تخریب بافتی برش‌های مختلف بیضه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که میانگین تخریب بافت بیضه در گروه تیمار با اتانول به‌شکل معنی‌داری کاهش پیدا کرد (شکل ۴). این کاهش شدید در نتیجه‌ی افزایش نکروزیس و مرگ سلول‌های واقع در اپی‌تلیوم لوله‌های سمی‌نیفر می‌باشد. از آن‌جایی‌که این تخریب شدید در نتیجه‌ی اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد تولید شده از متابولیسم اتانول می‌یاشد. از این‌رو تیمار با موادی حاوی آنتی‌اکسیدانت‌های مختلف هستند می‌تواند اثرات تخریبی ایجاد را کاهش دهد. چون عصاره‌ی گیاه چای کوهی حاوی ترکیبات قوی آنتی‌اکسیدانتی می‌باشد. تیمار با این عصاره می‌تواند تاثیرات تخریبی مصرف اتانول را کاهش دهد. همان‌طوری‌که در گروه تیمار با عصاره گیاه چای کوهی شاهد بودیم، شاخص MTBS به‌شکل معنی‌داری صعود کرده و نزدیک به گروه کنترل می‌باشد (شکل ۴).

از سوی دیگر بررسی وزن نسبی بیضه نشان دهنده‌ی کاهش شدید وزن نسبی در گروه تیمار با اتانول می‌باشد. مطالعات قبلی هم نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی وزن بیضه‌ها در نتیجه‌ی مصرف اتانول کاهش می‌یابد. در واقع یافته‌های هیستولوژی نیز موید این آثار تخریبی

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. آتروفی و تخریب ایجاد شده در بافت بیضه می‌تواند عامل اصلی کاهش وزن بیضه باشد (۱).

کاهش آشکار در کیفیت اسپرمی در دهه‌های اخیر، توجه محققان را به تاثیر عوامل مختلف محیطی بر این کاهش، جلب کرده است. همان‌طوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود پارامترهای اسپرمی نظیر تعداد، تحرک و بقا در گروه تیمار با اتانول به شکل معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. مصرف اتانول نقش مهمی در کاهش پارامترهای اسپرمی دارد. محققان دریافته‌اند که کاهش کیفیت اسپرمی (کاهش پارامترهای اسپرمی) ارتباط مستقیمی با مصرف اتانول دارد. علاوه بر این شماری از مطالعات در حالت *In vitro* نیز، تاثیرات سمی اتانول بر عملکرد بیضه را نشان داده‌اند در برخی مطالعات نیز تأثیر مستقیم اتانول بر پارامترهای اسپرمی انسان (نظیر تحرک و مورفولوژی) بررسی شده است (۲۲). طالبی و همکاران (۲۳) نشان داده‌اند که مصرف اتانول منجر به کاهش معنی‌داری در درصد تحرک و همچنین یکپارچگی DNA دارد و همچنین مصرف اتانول می‌تواند تاتیراتی بر مورفولوژی طبیعی اسپرم بر جای بگذارد (۲۴) در مطالعات مارتینز و همکاران (۲۵) نیز مشخص شد که تحرک اسپرم اپیدیدیمی در رت‌های تیمار شده با اتانول کاهش می‌یابد. مشاهداتی که بر روی حیواناتی که به شکل حاد و مزمن اتانول مصرف کردند نشان داد که در بدن این حیوانات سطح رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد همچنین مطالعات نشان داده است که مصرف الکل سطح آنتی‌اکسیدانت‌های بدن را کاهش می‌دهد و منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۶). Atiken و همکاران (۲۷) نشان دادند که تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) منجر به کاهش تحرک اسپرم‌ها می‌شود. در واقع می‌توان گفت که یکی از مسیرهایی که از طریق آن الکل منجر به تغییرات تحرک اسپرم‌ها می‌گردد، تولید ROS در نتیجه متابولیسم و در نهایت ایجاد استرس اکسیداتیو در بدن می‌باشد.

علاوه بر این مشاهدات نشان داده است که قرار گرفتن انواع سلول‌های با منشا انسانی و رت در معرض اتانول، منجر به تغییر ساختاری اسکلت سلولی می‌شود (۲۸). لذا می‌توان گفت که یکی از مسیرهایی که اتانول منجر به کاهش تحرک اسپرم‌ها می‌شود، تغییر در ساختار اسکلت سلولی واقع در دم اسپرم‌ها می‌باشد که در تحرک اسپرم نقش اساسی را ایفا می‌کنند. در مطالعه‌ی حاضر، تیمار با عصاره‌ی هیدرو اتانولی گیاه چای کوهی، توانست اثرات سو ناشی از مصرف اتانول را بر روی پارامترهای اسپرمی نظیر تعداد، تحرک و بقا را به میزان زیادی ممانعت کند. همسو با نتایج ما، مطالعاتی در زمینه‌ی اثرات فراورده‌های طبیعی بر روی مدل‌های مختلف استرس اکسیداتیو صورت گرفته است که در اکثر این مطالعات، ماده‌ی دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانتی توانسته است اثرات رادیکال‌های آزاد را خنثی نماید و مانع از تخریب سلول و نقص عملکردی اندام‌ها تحت شرایط استرس اکسیداتیو می‌شود. به‌عنوان مثال در مطالعه‌ایی که توسط Pomjunya و همکاران (۲۹) صورت گرفت مشخص شد که تیمار با عصاره‌یVernoniacinerea توانست اثرات استرس اکسیداتیوی القا شده توسط دیابت را بر روی پارامترهای اسپرمی، ممانعت کند.

همچنین Uygur و همکاران (۳۰) نشان دادند که استفاده از ترکیب کوئرستین (Quercetin) و اسیدهای چرب امگا ۳ موجود در روغن ماهی می‌تواند سیستم تولیدمثلی را در برابر آسیب‌های ناشی از مصرف الکل، حمایت کند. عوامل مختلف محیطی نظیر فلزات سنگین، امواج پرتوزا و یونیزه کننده، سموم، داروها و امواج مغناطیسی و همچنین عوامل دیگری نظیر بیماری‌های متابولیک مانند دیابت، مصرف سیگار و مصرف الکل منجر به آسیب‌های جدی به اندام‌های حیاتی بدن می‌شوند. مکانیسم اصلی که به‌واسطه‌ی آن اکثر این عوامل باعث ایجاد آسیب‌های بافتی مختلف می‌شوند، از طریق تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد. بنابراین یکی از استراتژی‌های

www.SID.ir

Archive of SID

درمانی برای مقابله با آسیب‌های ناشی از این عوامل مختلف که مصرف الکل نیز یکی از آن‌ها می‌باشد، مصرف فراورده‌هایی هست که بتوانند با روبش این رادیکال‌های آزاد تولید شده، اندام‌ها و بافت‌های جانوری را در برابر آسیب‌های ناشی از ایجاد حالت استرس اکسیداتیو، حمایت کنند (۳۱). عصاره‌های گیاهی دارای ترکیبات فیتوشیمیایی مختلفی از جمله پلی‌فنل‌ها هستند که می‌توانند به‌عنوان عوامل آنتی اکسیدانتی عمل کنند. پلی‌فنل‌ها ترکیبات با توانایی احیا کنندگی بالا می‌توانند با رادیکال‌های آزاد مانند گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) واکنش دهند و باعث کاهش استرس اکسیداتیو و در نهایت خسارات ناشی از آن به سلول‌ها و بافت‌های بدن شوند (۲۶). همچنین فنولیک اسیدها با داشتن ساختار ویژه دارای پتانسیل بالایی برای بر همکنش با پروتئین‌های مختلف از جمله آنزیم‌ها می‌باشند. به همین دلیل آن‌ها می‌توانند باعث ممانعت از فعالیت آنزیم‌هایی مانند ایزوفرم‌های مختلف سیتوکرم P450، سیکلواکسیژناز، الکل دهیدروژناز، لیپو اکسیژناز و زانتین اکسیداز شوند که در طی فعالیت خود مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند و از طرفی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی را افزایش دهند (۳۲ و ۳۳). از آن‌جایی‌که گیاه چای‌کوهی دارای ترکیبات فعال زیستی متنوعی می‌باشد که باعث شده در بسیاری از مدل‌های مختلف استرس اکسیداتیو نقش حمایتی قوی ایفا کند. لذا می‌توان گفت که نقش حمایتی که این گیاه در برابر آسیب‌های بافت بیضه القا شده با اتانول ایفا می‌کند به‌واسطه همین ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی و ضد التهابی آن می‌باشد.

نتیجه گیری

به‌طور خلاصه می‌توان گفت که عصاره هیدرو اتانولی بخش هوایی گیاه چای کوهی می‌تواند نقش حفاظتی بر علیه آسیب‌های القا شده توسط اتانول داشته باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی هیدرواتانولی چای کوهی باعث بهبود پارامترهای اسپرمی در حین مصرف اتانول می‌شود. همچنین شاخص های هیستولوژیکی نیز نشان دهنده‌ی تاثیرات حمایتی این گیاه بر ضد تاثیرات تخریب حاصل از مصرف اتانول می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا که تسهیلات لازم جهت انجام پروژه را فراهم نمودند، کمال تشکر را دارد.

منابع

1.Van Thiel DH, Gavaler JS, Cobb CF, Sherins RJ, et al. Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. Endocrinology. 1979; 105(4): 888-95.

2. Boiesen PT, Lindholm J, Hagen C, Bahnsen M, et al. Histological changes in testicular biopsies from chronic alcoholics with and without Liver diseas ctapathologica microbiologica Scandinavica Section A Pathology. 1979; 87(1-6): 139-42.

3. Adaramoye OA, Arisekola M. Kolaviron, a biflavonoid complex from Garcinia kola seeds, ameliorates ethanol-induced reproductive toxicity in male wistar rats. Nigerian Journal of Physiological Sciences. 2013; 28(1): 9-15.

4. Yamauchi M, Potter JJ, Mezey E. Detection and localization of immunoreactive alcohol dehydrogenase protein in the rat testis. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 1988; 12(1): 143-146.

5. Chiao YB, Van Thiel DH. Characterization of rat testicular alcohol dehydrogenase. Alcohol and Alcoholism. 1986; 21(1): 9-15.

6. Murono EP, Fisher-Simpson V. Partial characterization of alcohol dehydrogenase activity in purified rat Leydig cells. Archives of andrology. 1986; 17(1): 39-47.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Colantoni A, La Paglia N, De Maria N, Emanuele MA, et al. Influence of sex hormonal status on alcohol-induced oxidative injury in male and female rat liver. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 2000; 24(9): 1467-73.
8. Minae B, Sardari M, Sharifi H, Abadi MS, et al. StachyslavandulifoliaVahl. and its relation with marmazad activities in traditional manuscripts. Iranian Red Crescent Medical Journal. 2015; 17(11): e19932.
9. Işcan G, Demirci B, Demirci F, Göger F, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Stachyslavandulifolia subsp. lavandulifolia essential oil and its infusion. Natural product communications. 2012; 7(9): 1241-4.
10. Rabbani M, Sajjadi SE, Zarei HR. Anxiolytic effects of StachyslavandulifoliaVahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. Journal of ethnopharmacology. 2003; 89(2-3): 271-6.
11. Fooladvand Z, Fazeli-nasab B. Antibacterial activities of StachyslavandulifoliaVahl. extract against eight bacteria. Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs). 2014; 5(1): 13-8.
12. Hajhashemi V, Ghannadi A, Sedighifar S. Analgesic and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic, polyphenolic and boiled extracts of Stachyslavandulifolia. Research in Pharmaceutical Sciences. 2007; 1(2): 92-8.
13. Jenabi E, Asltoghiri M, Hajiloomohajeran M, Torkamani M. Effect of Stachyslavandulifolia on fatigue, nausea and vomiting associated with primary dysmenorrheal. Procedia-Social and Behavioral Sciences. 2012; 31: 124-8.
14. Naghibi F, Mosaddegh M, MohammadiMotamed M, Ghorbani A. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2010; 2: 63-79.
15. Jafarzadeh L, Asgari A. Teratogenic effects of hydroalcoholic extract of StachyslavandulifoliaVahl on the skeletal system and fetal growth in Balb/c mice. Journal of ShahrekordUuniversity of Medical Sciences. 2012; 14.
16. Nasri S, Ramezanghorbani A, Kamalinejad M. Analgesic and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract of StachysLavandulifoliaVahl s, aerial parts in male mice. Armaghanedanesh. 2011; 16(2): 161-71.
17. Johnsen SG. Testicular biopsy score count–a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormone Research in Paediatrics. 1970; 1(1): 2-5.
18. Rashidi I, Movahedin M, Tiraihi T. The Effects of Pentoxifylline on Mouse Epididymal Sperm Parameters, Fertilization and Cleavage Rates after Short Time Preservation. IJRM. 2004; 2 (2): 51-0
19. Asadi MH, Zafari F, Sarveazad A, Abbasi M, et al. Saffron improves epididymal sperm parameters in rats exposed to cadmium. Nephro-urology monthly. 2014; 6(1): e12125
20. Anjum MR, Reddy PS. Recovery of lead-induced suppressed reproduction in male rats by testosterone. Andrologia. 2015; 47(5): 560-7.
21. Mufti SI, Eskelson CD, Odeleye OE, Nachiappan V. Alcohol-associated generation of oxygen free radicals and tumor promotion. Alcohol and Alcoholism. 1993; 28(6): 621-38.
22. Pajarinen J, Karhunen PJ, Savolainen V, Lalu K, et al. Moderate alcohol consumption and disorders of human spermatogenesis. Alcoholism: Clinical and Experimental Research. 1996;20(2):332-7.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Talebi AR, Sarcheshmeh AA, Khalili MA, Tabibnejad N. Effects of ethanol consumption on chromatin condensation and DNA integrity of epididymal spermatozoa in rat. Alcohol. 2011; 45(4): 403-9.
24. Nagy F, Pendergrass PB, Bowen DC, Yeager JC. A comparative study of cytological and physiological parameters of semen obtained from alcoholics and non-alcoholics. Alcohol and Alcoholism. 1986; 21(1): 17-23.
25. Martinez M, Macera S, De Assis GF, Pinheiro PF, et al. Structural evaluation of the effects of chronic ethanol ingestion on the testis of Calomyscallosus. Tissue and Cell. 2009; 41(3): 199-205.
26. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. Alcohol and alcoholism. 1994; 29(5): 513-22.
27. Aitken RJ. The Amoroso Lecture The human spermatozoon–a cell in crisis?. Journal of Reproduction and Fertility. 1999; 115(1): 1-7.
28. Donnelly GP, McClure N, Kennedy MS, Lewis SE. Direct effect of alcohol on the motility and morphology of human spermatozoa. Andrologia. 1999; 31(1): 43-7.
29. Pomjunya A, Ratthanophart J, Fungfuang W. Effects of Vernonia cinereaon reproductive performance in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Veterinary Medical Science. 2017; 79(3): 572-8.
30. Uygur R, Yagmurca M, Alkoc OA, Genc A, et al. Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. Andrologia. 2014; 46(4): 356-69.
31. Aseervatham GS, Sivasudha T, Jeyadevi R, Ananth DA. Environmental factors and unhealthy lifestyle influence oxidative stress in humans—an overview. Environmental Science and Pollution Research. 2013; 20(7): 4356-69.
32. Karamian R, Asadbegy M. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three Onobrychis species from Iran. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016 Jan 1; 22: 112-9.
33. Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000 May 15; 80(7): 985-1012.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2019; 9(4)

Evaluation of the protective effects of *Stachys lavandulifolia*Vahl. on ethanol induced testicular damages in Wistarrats

Yari S, Ph.D.[1]*, Karamian R, Ph.D.[1], Asadbegy AH, B.Sc.[2], Asadbegy M, Ph.D.[1], Rajabi M, Ph.D.[3]

1. Department of Biology, Faculty of Science, Hamedan Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Department of Nursing, Hamedan University of Medical Science, Malayer School of Nursing, ,Hamedan, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Science Islamic Azad University (Shahre-Qods Branch), Tehran, Iran

* Email corresponding author: s.yari@basu.ac.ir, yarisiamak@yahoo.com

Received: 21 Oct. 2018 Accepted: 13 Jan. 2019

Abstract

Aim: This study was aimed to examine the effects of Stachys lavandulifolia extract (SL) on ethanol-induced testicular damages.

Material and methods: In the current study, 24 male Wistar rats were divided into 4 groups: control, ethanol (5 g kg -10) and ethanol (5 g kg -1) + SL (500 mg kg-1) group and SL (500 mg kg-1). After the treatment for 4 weeks, mean seminiferous tubule diameter (MSTD) and Johnsen's mean testicular biopsy score (MTBS) criteria were used for histological evaluation. In addition, sperm parameters including sperm count and motility were analyzed.

Results: Our data indicate that ethanol administration caused a significant decrease in the sperm count and motility in the ethanol group but SL ameliorated this reduction in SL + ethanol group. Moreover, both MSTD and MTBS values were decreased in the ethanol-treated rats. However, administration of ethanol together with SL resulted in significant improvements in both of these values.

Conclusion: In conclusion, our study revealed that the reproductive toxicity was caused by ethanol may be prevented by SL treatment

Key Words: Ethanol, StachysLavandulifolia, Testis, Rat.

www.SID.ir