مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۴، شماره‌ی ۱۰۷، بهمن و اسفند ۱۳۹۵، صفحات ۵۸ تا ۷۰

بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ی هیدرواتانولی برگ گیاه شمعدانی عطری (*Pelargonium graveolens* L.) بر تعداد اسپرم و بافت بیضه در موش‌های صحرایی نر تیمار شده با استات سرب

دکتر ناصر میرازی[۱]

نویسنده‌ی مسوول: گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان mirazi@basu.ac.ir

دریافت: ۹۴/۵/۱۳ پذیرش: ۹۵/۱/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: *سرب یکی از مهم‌ترین آلوده کننده‌های محیط زیست می‌باشد. استفاده از گیاهان دارویی مانند عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری ممکن است از ایجاد صدمات ناشی از سرب جلوگیری کند. دراین مطالعه به بررسی اثر حفاظتی عصاره‌ی هیدرواتانولی برگ گیاه شمعدانی عطری بر اثرات نامطلوب سرب در فرآیند اسپرماتوژنز در موش صحرایی نر پرداخته شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی تجربی از ۴۲ سر موش صحرایی نر در ۶ گروه ۷ سری شامل گروه‌های کنترل، شاهد (دریافت کننده‌ی استات سرب، ppm ۵۰۰ در آب آشامیدنی)، تیمار با عصاره‌ی شمعدانی عطری (با دوز کم ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و دوز زیاد ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دریافت کننده‌ی استات سرب به همراه تیمار با عصاره‌ی دوز کم و دوز زیاد عصاره‌ی شمعدانی عطری به‌صورت خوراندن از راه لوله‌ی دهانی و به‌مدت یک ماه استفاده شد. نمونه‌های اپیدیدیم و بافت بیضه جهت انجام شمارش اسپرم و مطالعات بافت‌شناسی تهیه گردید. داده‌های هر آزمون با استفاده از روش آنالیز ANOVA و سپس آزمون توکی مورد بررسی قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *نتایج این پژوهش نشان داد که استات سرب موجب کاهش تعداد اسپرم و تخریب بافت بیضه نسبت به گروه کنترل می‌شود ($P<۰/۰۰۱$). عصاره‌ی شمعدانی عطری توانست اثر محافظتی بر بافت بیضه اعمال نماید و موجب افزایش تعداد اسپرم‌ها در موش‌های دریافت کننده استات سرب در مقایسه با گروه کنترل گردید ($P<۰/۰۰۱$).*

نتیجه‌گیری: *عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری قادر است از اثرات مخرب سرب بر بافت بیضه و اسپرماتوژنز در موش صحرایی جلوگیری کند. همچنین عصاره‌ی این گیاه موجب افزایش روند اسپرم سازی در موش‌های القا شده با استات سرب گردید.*

واژگان کلیدی: شمعدانی عطری، سرب، اسپرم، موش صحرایی، بیضه

مقدمه

جوامع صنعتی به دلیل استفاده از سرب در معرض مسمومیت‌های گسترده‌ای قرار دارند. علاوه بر این محیط زیست بشر و سایر جانداران با آلودگی هوای حاوی ترکیبات سمی از جمله سرب روز به روز در معرض خطر روز افزون می‌باشد. مطالعات دهه‌ی اخیر نشان می‌دهد تجمع سرب در بدن حتی به مقدار کم باعث مسمومیت شده و اثرات سوء زیادی بر ساختارهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بدن دارد (۲و۱). محققان گزارش کرده‌اند اثرات سمی سرب ممکن

۱- دکترای فیزیولوژی، دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

Archive of SID
www.SID.ir

است در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، خون، کلیه، قلب و عروق، سیستم‌های غدد درون ریز و ایمنی، مجرای معده‌ای - روده‌ای، دستگاه تولید مثل و استخوان ایجاد شود (۴و۳). سرب را به دو صورت ارگانیک و غیر ارگانیک در طبیعت می‌توان یافت. مکانیزم‌های اثرات زیان بار سرب بر دستگاه‌های مختلف بدن توسط محققین بررسی شده است و گزارش‌ها حاکی از آن است که این اثرات سمی سرب ممکن است از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه افزایش پراکسیداسیون لیپیدی باعث اختلال در عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن از جمله هورمون‌ها و دستگاه تولید مثلی شود (۶و۵). شاخص‌های مختلفی برای سنجش کارکرد دستگاه تولید مثل وجود دارند. ارزیابی کیفیت اسپرم یکی از شاخص‌های حساس برای ارزیابی عملکرد دستگاه تولید مثل است. غلظت هورمون‌های تولید مثلی در خون نیز از شاخص‌های حساس در ارزیابی عملکرد دستگاه تولید مثلی محسوب می‌شود. گنادوتروپین‌ها از جمله هورمون محرک فولیکولی (FSH) و هورمون لوتئینی (LH) مهم‌ترین هورمون‌های کنترل کننده‌ی فعالیت گنادها و در نتیجه تولید مثل هستند که باعث تنظیم فعالیت بیضه‌ها می‌شوند. نقش LH در تنظیم اسپرم سازی، نقشی غیر مستقیم و از راه تحریک سلول‌های بینابینی و تولید تستوسترون است. تستوسترون همراه با FSH بر لوله‌های اسپرم ساز تاثیر گذاشته و باعث اسپرم سازی می‌شود (۴). یکی از جنبه‌های اختلالات هورمونی ناشی از سرب تاثیر آن روی هورمون‌های تولید مثلی است. محققان نشان داده‌اند که سرب با تاثیر بر روی محور هیپوتالاموسی- هیپوفیزی- گنادی باعث به هم خوردن تعادل هورمون‌های تولید مثلی و در نتیجه کاهش باروری می‌شود (۷و۲). اختلالات هورمونی ناشی از مواجهه محیطی با سرب در کودکان و زنان باردار به‌عنوان یک مشکل سلامت عمومی شناخته می‌شود. قرارگیری در معرض سرب هنگام بارداری باعث کوتاه شدن دوره‌ی بارداری و افزایش مرگ و میر نوزاد می‌شود (۷). با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در علم پزشکی، عواملی مانند عدم رضایت بیماران از مصرف داروهای رایج، بروز عوارض جانبی ناشی از مصرف بیش از حد و طولانی مدت این داروها و تجویز نامناسب دارو توسط پزشکان سبب شده که تمایل به درمان‌های جایگزین و سنتی روز به روز افزایش یابد (۸). برخی از گیاهان یا عصاره‌های گیاهی در سراسر جهان شناخته شده است که در طب سنتی ملل به واسطه‌ی خواص مختلف در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۹). شمعدانی عطری یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی در طب سنتی ایران به شمار می‌آید. تاکنون اثرات ضد باکتریایی، ضداکسیدانی، ضد میکروبی (۱۰) و نیز اثر حفاظتی در برابر زخم معده درمورد این گیاه به اثبات رسیده است (۱۱). از آنجایی که تاکنون گزارشاتی از اثرات محافظتی عصاره گیاه شمعدانی عطری بر دستگاه تناسلی و بیضه در مقابل عوامل آسیب رسان سمی محیطی نظیر سرب انجام نشده است، و تاثیر سمی سرب بر تولید مثل از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد، برآن شدیم تا با این پژوهش اثرات محافظتی عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی را در بافت بیضه‌ی موش‌های صحرایی درمان شده با استات سرب را برای اولین بار در جهان مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ شمعدانی عطری: ابتدا برگ گیاه شمعدانی عطری از گلخانه‌ی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا به مقدار کافی تهیه و توسط متخصص گیاه شناس مورد شناسایی علمی قرار گرفت. سپس برگ‌ها در سایه به مدت دو هفته خشک و توسط آسیاب برقی کاملا پودر گردید. ۳۰۰ گرم پودر حاصل شده را در یک بشر دولیتری حاوی الکل اتیلیک ۸۰ درصد (۸۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک به‌همراه ۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر)

Archive of SID
www.SID.ir

ریخته به‌طوری که به‌میزان یک میلی‌لیتر روی آن را الکل فرا بگیرد. سپس ظرف مذکور را به‌مدت یک هفته در یخچال قرار داده تا کاملا ترکیبات محلول در الکل آن خارج گردد. بعد از یک هفته محتویات بشر را توسط کاغذ صافی ابتدا صاف نموده و سپس مایع صاف شده توسط دستگاه روتاری (LABORATA 4001 Efficient, Germany Heidolph) با دور ۶۰ دور در دقیقه و دمای ۵۰ درجه تغلیظ گردید. عصاره‌ی غلیظ شده را به مدت دو روز در زیر هود قرار داده شد تا کاملا خشک گردد. از عصاره‌ی غلیظ شده غلظت های مورد نظر تهیه و به حیوانات توسط روش گاواژ کردن خورانده شد.

حیوانات آزمایشگاهی: در این مطالعه ۴۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرمی از موسسه‌ی پاستور تهران خریداری شد. موش‌ها به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سیکل روشنایی- تاریکی دوازده ساعته جهت سازش با محیط و در قفس‌های مخصوص و با دسترسی آزاد به آب و غذا قرار داده شدند. آزمایشات بر روی تمامی گروه‌ها در شرایط کاملا یکسان و پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی و همچنین کمیته اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بوعلی سینا با شماره‌ی مجوز ۱۵۲-۴۸ انجام گردید. سپس موش‌ها به‌طور تصادفی به ۶ گروه ۷ سری تقسیم شدند.

گروه بندی حیوانات:

۱- گروه کنترل: این گروه تحت هیچ تیماری قرار نگرفت.

۲- گروه شاهد: این گروه استات سرب را در آب آشامیدنی به میزان ۵۰۰ قسمت در میلیون دریافت کرد.

۳- گروه تیمار ۱: این گروه دوز کم عصاره‌ی شمعدانی عطری را روزانه به میزان۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلو وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند.

۴- گروه تیمار ۲: این گروه دوز زیاد عصاره‌ی شمعدانی عطری را روزانه به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلو وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند. (۱۲).

۵- گروه دریافت کننده استات سرب و تیمار شده با دوز کم عصاره برگ گیاه شمعدانی عطری: این گروه استات سرب را در آب آشامیدنی به میزان ۵۰۰ قسمت در میلیون به‌مدت چهار هفته دریافت نمودند. همچنین روزانه دوز کم عصاره‌ی شمعدانی عطری به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلو وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند.

۶- گروه دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با دوز زیاد عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری: این گروه استات سرب را در آب آشامیدنی به میزان ۵۰۰ قسمت در میلیون به‌مدت چهار هفته دریافت نمودند. همچنین روزانه دوز زیاد عصاره‌ی شمعدانی عطری به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلو وزن بدن به صورت گاواژ دریافت کردند (۴).

لازم به ذکر است تمامی گروه‌ها تا پایان آزمایشات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. پس از پایان آزمایشات، موش‌ها ابتدا توزین شده و سپس با اتر بیهوش گردیدند. بعد از لاپاراتومی شکم، بیضه‌های هر حیوان از بدن جداگردیده و ابعاد آن اندازه‌گیری و توزین شد و بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد جهت فیکس شدن قرار داده شد. جهت تعیین تعداد اسپرم، اپیدیدیم بیضه چپ حیوانات به‌دقت توسط قیچی جدا شده و سپس در سرم فیزیولوژی با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد شستشو داده شد تا عاری از خون گردد. بافت اپیدیدیم در یک پتری دیش حاوی ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین کاملا خرد شد و سپس حجم محلول به ۵ میلی‌لیتر رسانیده شد. پس از به هم زدن آن به‌مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس یک قطره از نمونه مایع حاوی اسپرم‌های به دست آمده (حجم ۵ میلی‌لیتر که حاوی اسپرم‌های اپیدیدیمی بود) را روی لام نئوبار قرار داده و برای شمارش اسپرم‌ها از مربع‌های مربوط به گلبول‌های سفید استفاده شد. تعداد اسپرم‌های محاسبه شده

Archive of SID
www.SID.ir

با استفاده از فرمول زیر:

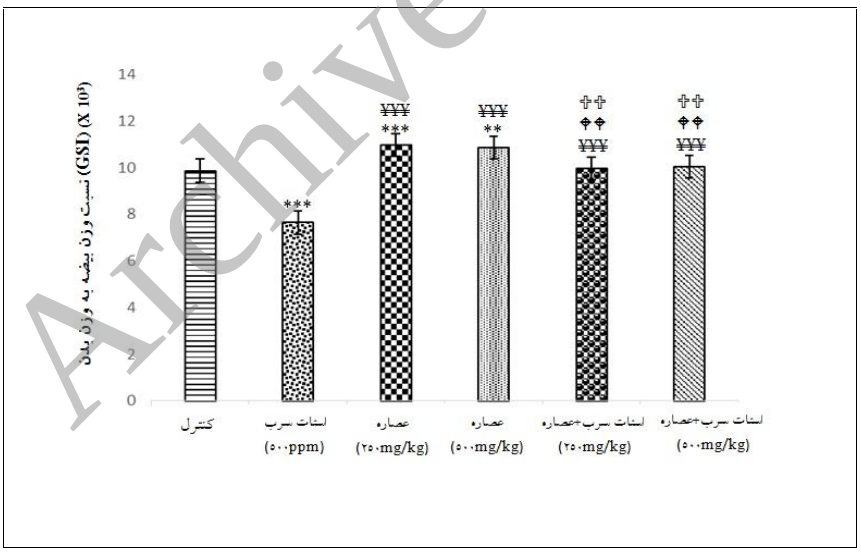
(ضریب رقت) ۵ × $۱۰^{۴}$ × تعداد اسپرم شمارش شده

تعیین گردید (۱۲). پس از ۷۲ ساعت از بیضه هر حیوان مقاطع بافت شناسی تهیه و با استفاده از هماتوکسیلین- ائوزین رنگ آمیزی گردید. برای ارزیابی نمونه‌ها از هر نمونه بیضه ۳ لام مقطع بافتی تهیه شد و از هر لام شمارش سلول‌های اسپرماتوگونی در ده میدان میکروسکوپی انجام و میانگین آنها محاسبه گردید.

آزمون‌های آماری: کلیه‌ی آنالیزهای آماری با استفاده از SPSS-19 انجام شد. داده‌ها به‌صورت mean±SEM ارایه گردیدند و جهت تجزیه و تحلیل آماری از روش آماری ANOVA و تست Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری P<۰/۰ ۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

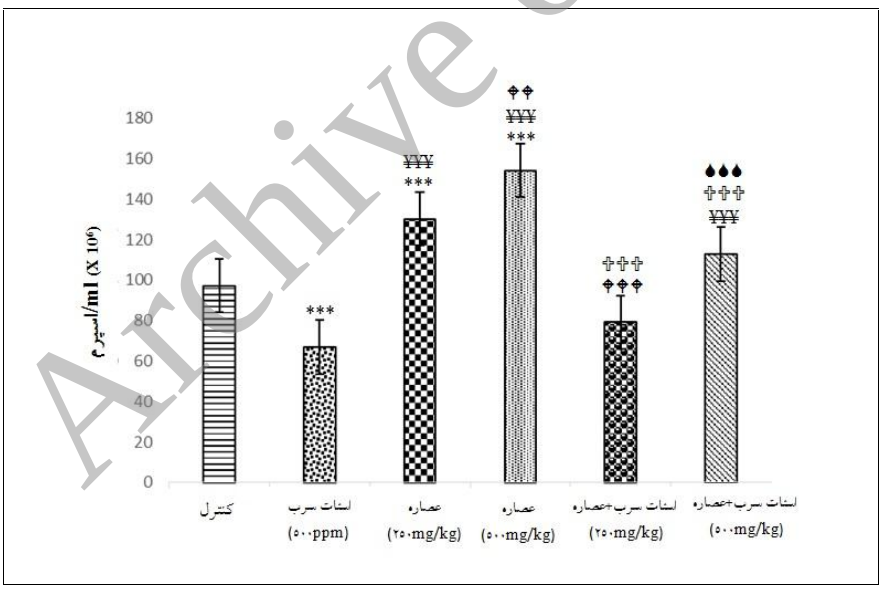
نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که مقایسه‌ی وزن موش‌های دریافت کننده‌ی استات سرب و همچنین میانگین وزن بیضه‌ی آن‌ها نسبت به گروه کنترل از کاهش وزن بیشتری برخوردار بود. همچنین نسبت میانگین وزن بیضه‌ها نسبت به وزن بدن یا پارامتر GSI(Gonado Somatic Index) در گروه دریافت کننده‌ی استات سرب نسبت به گروه کنترل نیز کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۱) گروه‌های تیمار ۱ و۲ دریافت کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی، شاخص GSI معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل داشتند (P<۰/۰۱). در حالی که شاخص GSI در گروه‌های دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با دوزهای کم و زیاد عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند (P>۰/۰۵) (نمودار ۱).



نمودار ۱: بررسی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری نسبت وزن بیضه به وزن بدن (GSI) در گروه‌های مختلف مورد آزمایش در موش‌های صحرایی نر * بیان‌گر معناداری نسبت به گروه کنترل، ¥ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده استات سرب ♦ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ✝ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، (**:P< ۰/۰۱) (:P< ۰/۰۰۱)، (¥¥¥:P< ۰/۰۰۱)، (♦♦:P< ۰/۰۱) (✝✝:P< ۰/۰۱)***

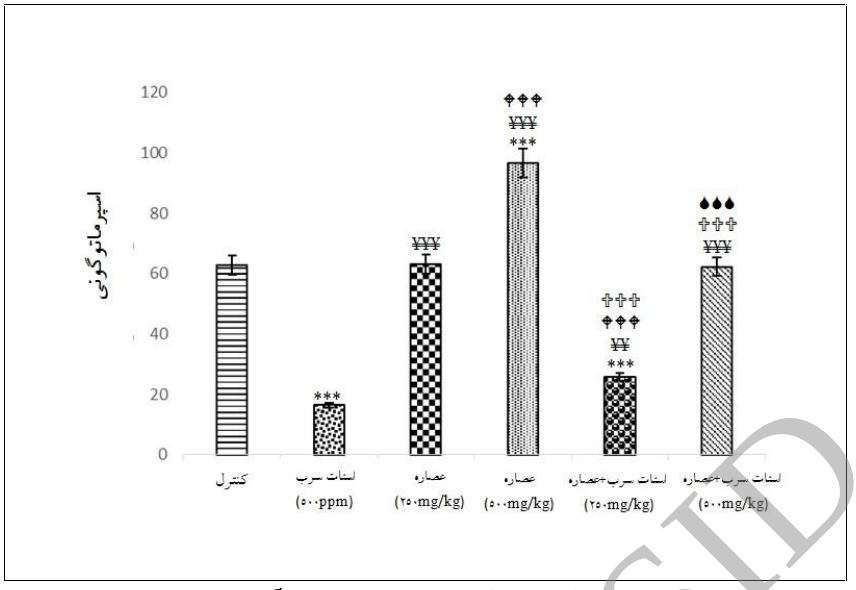
Archive of SID
www.SID.ir

بر اساس یافته‌ای حاصل شده در این پژوهش، میانگین تعداد اسپرم‌ها در گروه شاهد در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۰۱) همچنین تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های دریافت کننده‌ی عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده‌ی استات سرب افزایش معنی‌داری را نشان دادند. تعداد اسپرم‌ها در گروه‌های دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با دوزهای کم و زیاد عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نداشتند. در حالی که این گروه‌ها دارای کاهش معنی‌دار نسبت به گروه‌های سالم تیمار شده با عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری داشتند (P<۰/۰۰۱)، (نمودار ۲). در بررسی داده‌های حاصل از شمارش سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های مختلف تحت آزمون در این پژوهش نشان داده شد که میانگین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در گروه‌های دریافت کننده‌ی استات سرب و همچنین دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با دوز کم عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری نسبت به گروه کنترل از کاهش معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۰۱). نتایج نشان داد که تعداد اسپرماتوگونی‌ها در گروه تیمار با دوز کم عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نداشت. در حالی‌که گروه تیمار شده با دوز زیاد عصاره‌ی فوق دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل و گروه دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با دوزهای کم و زیاد عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری داشتند (P<۰/۰۰۱). تعداد اسپرماتوگونی‌ها در گروه دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با عصاره‌ی شمعدانی عطری نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری نداشتند. در حالی که اختلاف حاصل شده در این گروه و گروه دریافت کننده‌ی استات سرب دارای افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی بود (P<۰/۰۰۱)، (نمودار ۳).



نمودار ۲: بررسی داده‌های حاصل از شمارش اسپرم در گروه‌های مختلف مورد آزمایش در موش‌های صحرایی نر. *بیان‌گر معناداری نسبت به گروه کنترل، ¥ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده استات سرب ♦ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ✝ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ♦ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده استات سرب + عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، (P<۰/۰۱ :)، (P<۰/۰۰۱ :¥¥¥)، (P<۰/۰۱ :♦♦) (P<۰/۰۰۱ :♦♦♦) (P<۰/۰۱ :✝✝) (P<۰/۰۰۱ :♦♦♦)***

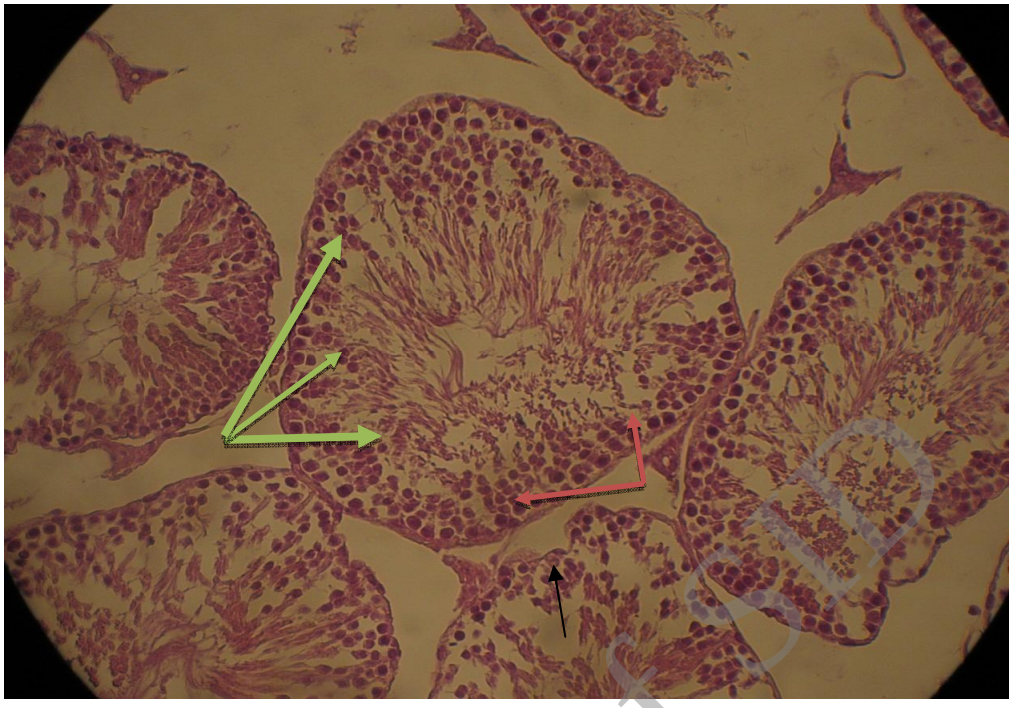
Archive of SID
www.SID.ir



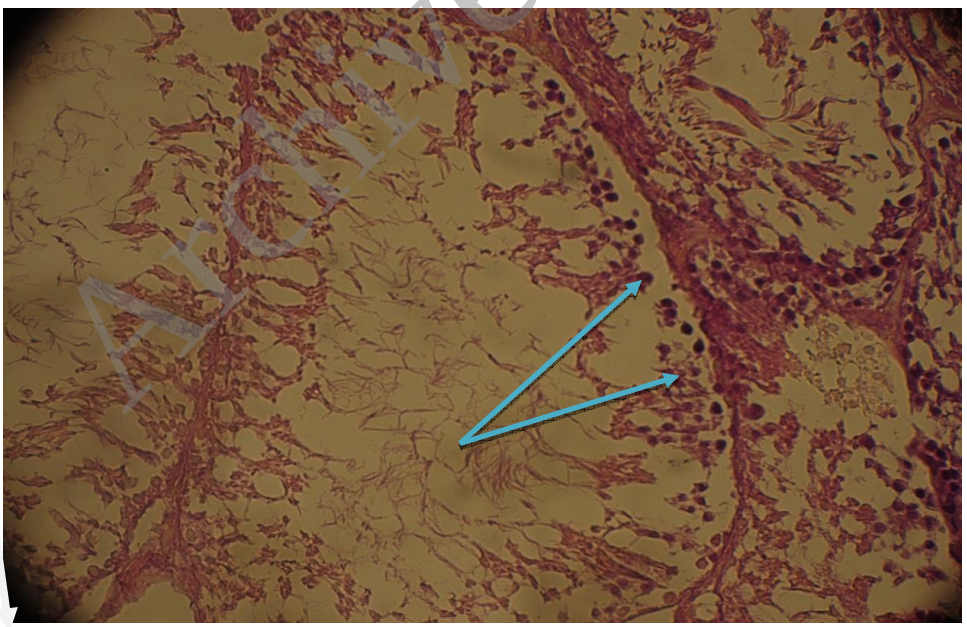
نمودار ۳: بررسی داده‌های حاصل از شمارش اسپرماتوگونی در گروه‌های مختلف مورد آزمایش در موش‌های صحرایی نر * بیان‌گر معناداری نسبت به گروه کنترل، ¥ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده استات سرب ♦ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ✝ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، ♦ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده استات سرب + عصاره هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری (۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (:P< ۰/۰۰۱)، (¥¥¥:P< ۰/۰۰۱)، (¥¥:P< ۰/۰۱) (♦♦♦:P< ۰/۰۰۱) (✝✝✝:P< ۰/۰۰۱)***

در مطالعات بافت شناسی انجام شده بر روی لام‌های مقاطع بافتی تهیه و رنگ آمیزی شده با روش هماتوکسیلین- ائوزین نشان داده شد که بافت بیضه، لوله‌های اسپرم ساز و همچنین داربست سلولی در گروه کنترل دارای نظم ساختاری بوده و انسجام بافتی هم در لول‌های اسپرم‌ساز و هم در سلول‌های بینابینی و تراکم اسپرم‌های موجود در وسط لوله‌های مذکور به‌طور طبیعی وجود دارد (شکل ۱). مطالعات بافت‌شناسی در این پژوهش نشان داد که بافت بیضه‌ی موش‌های دریافت کننده‌ی استات سرب به شدت در معرض آسیب بافتی قرار گرفته است. به‌طوری که در مقطع بافتی تهیه شده از بافت بیضه مشخص گردید که نظم سلولی در لوله‌های اسپرم ساز به‌شدت بهم ریخته شده و غشای بازال آن‌ها از بین رفته است. همچنین تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی کاهش زیاد داشته و علاوه بر آن از تعداد اسپرماتوسیت‌ها به‌میزان قابل توجهی کاسته شده است. علاوه بر این تعداد اسپرم‌های موجود در مرکز لوله‌های فوق نیز بسیار اندک می‌باشد. بافت بینابینی نیز تخریب گشته و سلول‌های لیدیگ مستقر در این ناحیه نیز به تعداد بسیار کمی دیده می‌شود (شکل ۲). در نمونه‌های بافتی تهیه شده از بافت بیضه گروه‌های دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با دوزهای کم و زیاد عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری به‌طور کاملا واضحی مشاهده گردید که بافت بیضه انسجام بافتی خود را به‌دست آورده و تشکیلات سلولی و همچنین تعداد سلول‌های موجود در لوله‌های اسپرم ساز به سمت طبیعی شدن پیش رفته‌اند. تراکم اسپرم‌ها نیز در مرکز لول‌های اسپرم ساز در مقایسه با گروه دریافت کننده‌ی استات سرب، رو به افزایش نشان داده شده است (شکل‌های ۳و۴).

Archive of SID
www.SID.ir

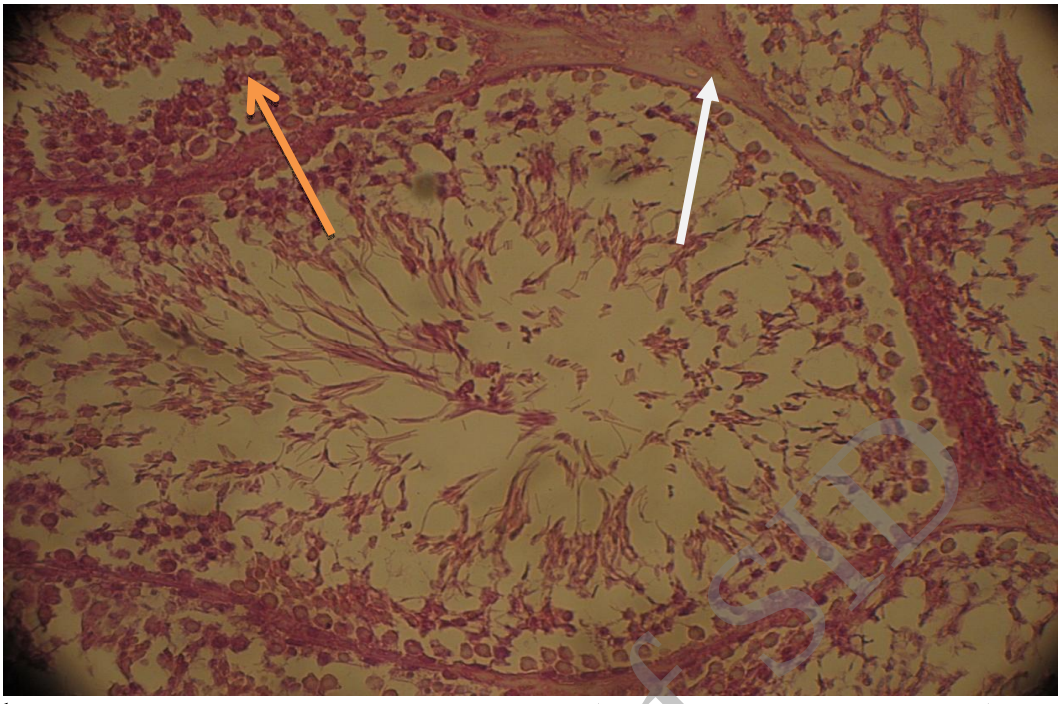


شکل ۱: فتو میکروگراف تهیه شده از بافت بیضه در موش‌های گروه کنترل. رنگ آمیزی H&E با بزرگنمایی X100، سلول‌های اسپرماتوگونی (پیکان قرمز)، سلول‌های اسپرماتوسیت (پیکان سبز)

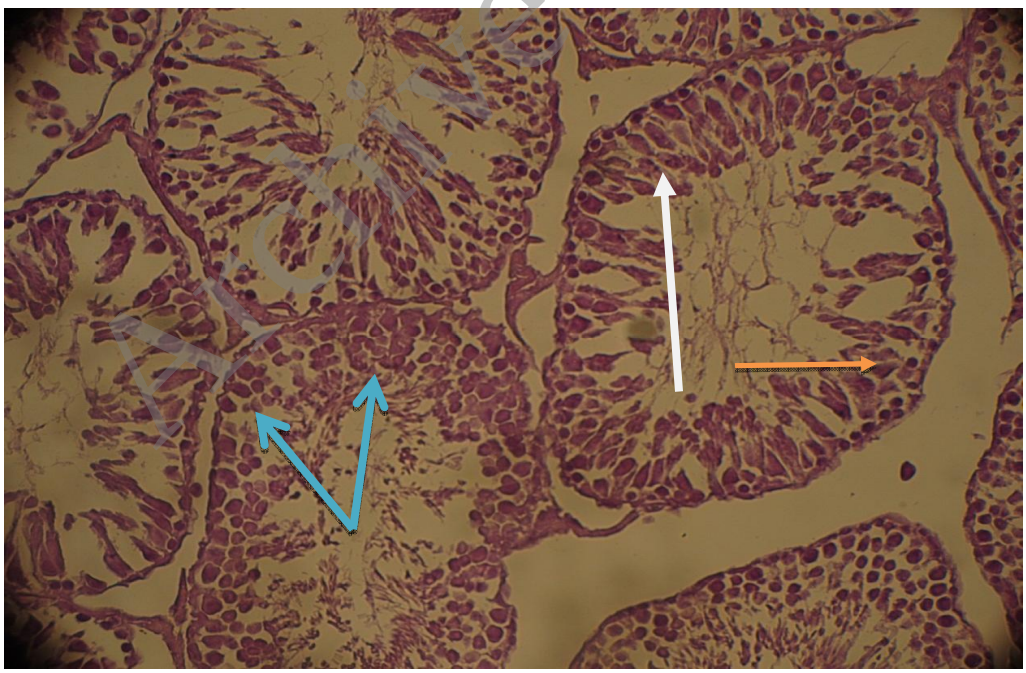


شکل ۲: فتو میکروگراف تهیه شده از بافت بیضه در موش‌های گروه شاهد. رنگ آمیزی H&E با بزرگنمایی X100، سلول لیدیگ (پیکان سفید)، سلول اسپرماتوگونی (پیکان آبی) بهم ریختگی ساختار سلولی در لوله‌های منی ساز مشاهد می شود

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳: فتو میکروگراف تهیه شده از بافت بیضه در موش‌های گروه دریافت کننده استات سرب و تیمار شده با عصاره دوز کم. رنگ آمیزی H&E با بزرگنمایی X400، سلول لیدیگ (پیکان سفید)، سلول سرتولی (پیکان نارنجی)



شکل ۴: فتو میکروگراف تهیه شده از بافت بیضه در موش‌های گروه دریافت کننده استات سرب و تیمار شده با دوز زیاد عصاره. رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی X400 ، ساختار لوله‌ای و نظم سلولی بهبود یافته است. سلول اسپرماتوسیت (پیکان سفید)، سلول سرتولی (پیکان نارنجی)، سلول‌های اسپرماتوگونی (پیکان آبی)

www.SID.ir

بحث

در این پژوهش نشان داده شد که استفاده از استات سرب در موش‌های صحرایی مورد آزمون موجب آسیب بسیار جدی و واضح بر بافت بیضه شده است. به‌طوری که تعداد اسپرماتوگونی‌ها، اسپرم‌ها و سایر سلول‌های موجود در روند اسپرم‌سازی کاهش قابل ملاحظه و معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پیدا می‌نمایند. از طرف دیگر تیمار موش‌های دریافت کننده‌ی استات سرب با عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری از آسیب وارد شده به‌بافت بیضه‌ها و همچنین سلول‌های مستقر در آن‌ها می‌کاهد. این نتایج حکایت از اثرات محافظتی عصاره‌ی گیاه شمعدانی عطری بر بافت بیضه در موش‌های صحرایی مورد آزمون در این پژوهش دارد. اغلب مطالعات از اثرات تخریبی بافتی سرب و مشتقات آن بر بدن، از جمله دستگاه تناسلی حکایت دارد نتایج حاصل شده در این پژوهش با مطالعات انجام شده توسط احمد و همکاران و ایت و همکاران که اثرات تخریبی استات سرب را بر بافت بیضه نشان دادند همسو می‌باشد (۲و۱). سرب موجب تخریب بافت‌های بدن و همچنین آزاد شدن رادیکال آزاد از بافت‌های آسیب دیده می شود. از آن جایی که استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها و تغییر خاصیت غشایی باعث ایجاد مرگ سلول‌های زایا در مراحل مختلف تکثیر و نمو و همچنین کاهش تعداد اسپرم‌ها می‌شود و پراکسید هیدروژن قادر است اسپرم‌ها را بی‌حرکت سازد، آنتی‌اکسیدان‌ها از آسیب سلول اسپرم توسط رادیکال‌های آزاد محافظت می‌نماید و کیفیت اسپرم را بهبود می‌بخشند. میتیلا و همکارانش نشان دادند که شمعدانی عطری یکی از گیاهان حاوی انواع مختلفی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر ژرانیول، کوئرستین، سیترونلول، ترپینئول و الکل‌ها می‌باشد (۱۳). در مطالعه‌ای که توسط آکاریا و همکارنش انجام شد نشان داده شد که ژرانیول و کوئرستین از آنتی‌اکسیدان‌های بسیار موثر ممانعت کننده از روند تخریبی عوامل آسیب رسان بافتی مانند ترکیبات سمی همچون استات سرب و یا سایر اکسید کننده می‌باشند (۱۴). احتمال می‌رود که اثرات محافظتی از بافت بیضه در موش‌های دریافت کننده‌ی استات سرب و تیمار شده با عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی عطری به خاطر وجود ترکیبات شیمیایی فوق باشد که نتایج این تحقیق همسو با نتایج به دست آمده آکاریا و همکارانش شده است. کوئرستین موجود در گیاه شمعدانی عطری دارای اثر محافظتی بر سلول‌های اسپرماتوگونی تحت استرس اکسیداتیو است و با دادن الکترون به گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تخریب DNA سلولی را کاهش می‌دهد (۱۵). وارگاس و همکارانش طی تحقیقی نشان دادند که ترکیبات ژرانیول و کوئرستین دارای اثر مثبت در سطح سرمی تستوسترون در مردان می‌باشد (۱۶). سوکول و همکاران نشان دادند که سرب سبب کاهش تعداد اسپرم‌ها می‌شود ولی سبب کاهش وزن بیضه و کیسه‌ی منوی نمی‌گردد (۱۷). نتایج این تحقیق همسو با یافته‌های بوند و همکارانش می‌باشد. آنان در مطالعه‌ای نشان دادن که سرب باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها در مایع منی در مردانی که در معرض اثرات سم سرب بودند شد (۱۸). شمعدانی عطری حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات شیمیایی گیاهی نظیر کوئینین، کربوهیدرات‌ها، تانن‌ها، انواع پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌باشد. همچنین انواع ویتامین‌ها نظیر تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، فولات، پانتتونیک اسید، فمیلیک اسید، گالیک اسید و فنولیک اسید می‌باشد (۱۹). تحقیقات نشان داده‌اند که ترکیبات ویتامینی فوق نقش آنتی‌اکسیدانی و محافظتی قوی از رادیکال‌های آزاد را به‌طور گسترده در بدن ایفا می‌نمایند (۲۰). در مطالعه‌ای گراکا و همکارانش نشان دادند که در اثر تجویز سرب وزن بیضه‌ها، قطر لوله‌های منی ساز و تعداد اسپرم‌ها کاهش می‌یابد و نیز این اثرات با گذشت زمان قابل برگشت می‌باشد (۲۱). در این مطالعه نتایج به‌دست آمده همسو با نتایج فوق بودند و نشان داد که سرب باعث کاهش تعداد اسپرم‌ها، اسپرماتوگونی‌ها و سایر سلول‌های روند

Archive of SID
www.SID.ir

اسپرماتوژنز در موش‌ها می‌گردد. اغلب پژوهش‌ها نشان دادند که سرب موجب کاهش وزن بدن و وزن بیضه‌ها می‌گردد. همچنین نسبت وزن بیضه‌ها به وزن بدن یا پارامتر GSI در موش‌های دریافت کننده سرب نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (۲۲). نتایج به‌دست آمده توسط ما نیز ضمن تایید نتایج فوق، نشان داد که پارامتر GSI در موش‌های شاهد نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را دارد. در سایر گروه‌های تیمار شده با عصاره‌ی برگ گیاه شمعدانی پارامتر GSI افزایش نشان داده شد و با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی‌دار گردید. این اثر احتمالا به دلیل اثرات محافظتی عصاره‌ی گیاه شمعدانی عطری در مقابل اثرات زیان بار سلولی استات سرب می‌باشد. شان و همکارانش نیز اثر اسکوربیک اسید و تیامین را در ظرف ۶ هفته بر موش‌هایی که همزمان سرب را به صورت اینترگاستریک دریافت می‌کردند بررسی نمودند. در گروه سرب کاهش تعداد و حرکت اسپرم‌ها نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در حالی که در گروه اسکوربیک اسید این پارامترها بالاتر بودند. بدین ترتیب اسکوربیک اسید همراه با تیامین می‌تواند نقش محافظتی را در مقابل سرب بر دستگاه تناسلی ایفا نماید (۲۳). بررسی‌ها نشان داده‌اند که گیاه شمعدانی عطری مقادیر زیادی ویتامین‌های B (از جمله تیامین) و ویتامین C دارد. نقش این ویتامین‌ها در بدن و اثرات محافظتی آن‌ها اثبات شده است. بنابراین احتمال دارد که اثر محافظتی عصاره‌ی این گیاه به خاطر داشتن انواعی از ویتامین‌ها از جمله تیامین موجود در آن باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، سرب می‌تواند باعث کاهش اسپرم‌ها، تخریب بافت بیضه و آسیب ناهنجار به سلول‌های اسپرم ساز گردد. استفاده از عصاره‌ی هیدروالکلی برگ گیاه شمعدانی عطری نشان داد عصاره‌ی این گیاه احتمالا به دلیل دارا بودن ترکیبات شیمیایی اختصاصی قادر است از تخریب بافت بیضه جلوگیری به عمل آورد و بافت بیضه را در مقابل اثرات سمی سرب محافظت کند.

تشکر و قدردانی

در پایان لازم می‌دانیم از زحمات بی‌دریغ آقای دکتر رمضان کلوندی متخصص گیاه‌شناسی مرکز تحقیقات کشاورزی همدان در تعیین جنس و گونه‌ی گیاه شمعدانی عطری و همچنین پرسنل آزمایشگاه تحقیقات فیزیولوژی جانوری دانشگاه بوعلی سینا که ما را یاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر نماییم.

References

1- Ahamed M, Siddiqui MK. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions. *Clin Chim Acta*. 2007; 383: 57-64.

2- Ait HN, Slimani M, Merad-Bodia B, Zaoui C. Reproductive toxicity of lead acetate in adult male rats. *Am J Sci Res*. 2009; 1: 38-50.

3- Hamadouche NA, Slimani M, Merad-Boudia B, Zaoui C. Reproductive toxicity of lead acetate in adult rats. *Am J Sci Res*. 2009; 3: 38-50.

4- Wang C, Zhang Y, Liang J, Shan G, Wang Y, Shi Q. Impacts of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in testis. *Clin Chim Acta*. 2006; 370: 82-8.

5- Reglero MM, Taggart MA, Castellanos P, Mateo R. Reduced sperm quality in relation to oxidative stress in red deer from a lead mining area. *Environ Pollut*. 2009; 157: 2209-15.

6- Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F,

Archive of SID
www.SID.ir

Kalender Y. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47: 1903-8.

7- Mares AK, Abid W, Najam WS. The effect of ginger on semen parameters and serum FSH, LH& testosterone of infertile men. *Tikirit Med J.* 2012; 18: 34-9.

8- Davis SN. Insulin, Oral Hypoglycemic agents and the pharmacology of the endocrine pancreas in goodman and gilmans the pharmacological basis of therapeutics. Brunton LL, Ed, McGraw-Hill, New York. 2006, 1613-45.

9- Oryan S, Eidi M, Yazdi E, Eidi A, Solati J. The hypoglycemic effect of alcoholic extract of mormal and diabetic rats. *J Med plants.* 2003; 2: 27-32.

10- Proestos, C, Chorianopoulos, N, ychas GJ, Komaitis M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts, Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J Agri Food Chem.* 2005; 53: 1190-95.

11- Farzaei F, Khazaei M, Abasabadi Z, Feyzmahdavi M. Protective effect of *Tragopogon graminifolius DC,* against ethanol induced gastric ulcer in rat, *Iran Red Cres Med J.* 2013; 15: 813-16.

12- Ola- Mudathir KF, Suru SM, Fafunso MA. Protective role of onion and garlic extracts on cadmium- induced changes in sperm charactristics and testicular oxidative damage in rats. F*ood Chem Toxicol*. 2008; 46: 3604-11.

13- Mithila J, Murch SJ, KrishnaRaj S, saxena PK. Recent advanced in Pelargonium in vitro regeneration system. *Plant Cell Tissue Org Cult.* 2001; 67: 1-9.

14- Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Report Toxicol.* 2008; 25: 84-88.

15- Li G, Ma A, Shi W, Zhong X. Qurectin protects hamster spermatogenesis cells from oxidative damage induced by diethylstilbestrol. *Andrologia.* 2010; 42: 285-90.

16- Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: Pathways and mechanisms of quercetin in cancerprevention and management. *Nutr Rev*. 2010; 68: 418-28.

17- Sokol RZ, Maddinq CF, Swredloff RS. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Biol Repord.* 1985; 33:722-8.

18- Bounde JP, Joffe M, Apostoli P, Dale A, Kissp P, Spano M. Sperm count and chromatin structure in men exposure to inorganic lead:lowest adverse effect levels. *Occup Environ Med.* 2002; 59: 234-42.

19- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, et al. Screening of plants extract for antioxidant activity: A comparative study on 3 testing methods. *Photochemical analysis*. 2002; 13: 8-17.

20- Oki M, Masuda S, Furuta Y, Nishida N, Terahara. Involvement of anthocyanins and other phenolic componds in radical-scavenging activity

Archive of SID

www.SID.ir

of purple-fleshed sweet potato cultivars. *J Food Sci*. 2002; 67: 1752-56.

21- Graça A, Ramalho-Santos J, de Lourdes Pereira M. Effect of lead chloride on spermatogenesis and sperm parameters in mice. *Asian J Androl*. 2004; 6: 237-41.

22- Dorostghoal M, Seyyednejad SM, Jabari A. Protective effects of *Fumaria parviflora L.* on lead-induced testicular toxicity in male rats. *Andrologia*. 2014; 46: 437-46.

23- Shan G, Tang T, Zhang X. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009; 29: 68-72.

Archive of SID

www.SID.ir

Protective Effect of Hydro-ethanolic Leaf Extract of *Pelargonium graveolens* L on Sperm Production and Testis Histology in Male Rats Treated with Lead Acetate

Mirazi N[1]

[1]Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran

Corresponding Author: Mirazi N, Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran

E-mail: mirazi@basu.ac.ir

Received: 4 Aug 2015 **Accepted:** 10 Apr 2016

Background and Objective: Lead is one of the most common environmental pollutants. The use of medicinal plants may protect tissues from lead damages. The aim of this study was to evaluate the protective effect of Pelargonium graveolens leaf extract (PGE) on spermatogenesis in male rats.

***Materials and Methods*:** Forty-two male rats with 220-250 gr body weight were randomly assigned to 6 groups(n=7): control (normal saline,0.5ml/day, gavage), witness group (lead acetate, 500 ppm in tap water), treated groups: (1; 250mg/kg PGE and 2; 500mg/kg PGE, gavage), and lead acetate-induced group (500 ppm in tap water) + treated by PGE (250mg/kg and 500mg/kg, daily gavage) for one month. After examination, the epididymis and testes tissues were collected for sperm counting and histological study. All data were expressed as mean±SEM, and statistically significant differences were accepted at $P<0.05$.

Results: Our results showed that the lead acetate decreased sperm numbers and damaged testis tissue. The PGE protected testes and significantly increased sperm number compared with witness group ($P<0.001$).

Conclusion: The Pelargonium graveolens hydro-ethanolic extract can protect the testis tissues against toxic effect of lead acetate.

Keywords: Pelargonium graveolens, Lead, Sperm, Rat, Testis

Archive of SID

www.SID.ir