Quarterly of the Horizon of Medical Sciences
Volume 21, Issue 1, Spring 2015
Pages: 21-29
Type: Original Research

Effect of Aqueous Extract of *Launaea acanthodes* on Testicular Tissue and Sperm Parameters in Alloxan-Induced Diabetic Rats

Rahbarian R.[1] *PhD*, Sepehri Moghadam H.[2] *PhD*, Sadoughi S.D.* *MSc*

*Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
[1]Biology Department, Sciences Faculty, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran
[2]Agriculture Department, Sciences Faculty, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: Diabetes cause oxidative stress in sperm and testicular tissue. The *Launaea acanthodes* has anti-oxidant and anti-diabetic effects. The present study was done to evaluate the effect of *Launaea acanthodes* extract on sperm parameters and testicular tissue in diabetic rats.

Materials & Methods: 27 rats were divided into the 3 equal groups; control, diabetic control and experimental diabetic. Experimental diabetic and diabetic control groups were got diabetic by an intraperitoneal injection of alloxan. Extract of *Launaea acanthodes* with concentration of 300mg/kg was injected intraperitoneally to the experimental diabetic group every other day for a month. Sterile distilled water was injected to control and diabetic control groups. After creating experimental diabetes, all injections were done every other day for a month. On day 30, all rats were sacrificed and their testes were removed for assessment of sperm parameters and histological evaluation. Data were analyzed by SPSS 20 software using Kruskal Wallis and Dunn post hoc test.

Findings: Percentage of progressive motility, natural forms and the number of sperms in treated diabetic group with extract of *Launaea acanthodes* with concentration of 300mg/kg were increased significantly compared to the diabetic control group ($p<0.05$). Average weight, length, width and average diameter of the tubules of the testes and the average thickness of the epithelium of the seminiferous tubule in diabetic group treated with extract of *Launaea acanthodes* were increased significantly compared to the diabetic control group ($p<0.05$).

Conclusion: Extract of *Launaea acanthodes* improves sperm parameters, increase sperm count and decrease atrophy of seminiferous tubules of diabetic rats.

Keywords
Diabetes Mellitus [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68003920];
Spermatozoa [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013094];
Testis [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013737];
Rats [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68051381]

*Corresponding Author
Tel: +985135013950
Fax: +985135013950
Address: Biology Department, Sciences Faculty, Payam-e-Noor University, Mo'allem Boulevard, Mashhad, Iran.
Post Box: 91735-433
damoon.Sadughi@gmail.com
Received: November 22, 2014 Accepted: February 28, 2015 ePublished: April 16, 2015

www.SID.ir

اثر عصاره آبی چرخه بر بافت بیضه و پارامترهای اسپرمی در موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با آلوکسان

راهله رهباریان PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
حشمت سپهری مقدم PhD
گروه کشاورزی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
سیددامون صدوقی* MSc
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

چکیده
اهداف: دیابت منجر به استرس اکسیداتیو در اسپرم و بافت بیضه می‌شود. گیاه چرخه دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتی است. این پژوهش با هدف بررسی اثر عصاره گیاه چرخه بر پارامترهای اسپرمی و تغییرات بافتی بیضه در موش‌های صحرایی دیابتی انجام شد.
مواد و روش‌ها: ۲۷ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به گروه‌های ۹تایی؛ شاهد سالم، شاهد دیابتی و تجربی دیابتی تقسیم شدند. گروه‌های شاهد دیابتی و تجربی دیابتی، با یک بار تزریق داخل‌صفاقی آلوکسان دیابتی شدند. گروه تجربی دیابتی یک روز در میان و به‌مدت یک ماه، عصاره آبی گیاه چرخه را به‌صورت داخل‌صفاقی و با غلظت ۳۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت نمودند. به گروه‌های شاهد سالم و شاهد دیابتی آب مقطر استریل تزریق شد. در روز ۳۰، موش‌های هر گروه کشته شده و بیضه آنها به‌منظور ارزیابی پارامترهای اسپرمی و بررسی بافتی خارج شد. نتایج توسط نرم‌افزار آماری SPSS 20 و آزمون‌های آماری کروسکال‌والیس و تعقیبی دان تحلیل شدند.
یافته‌ها: میانگین درصد حرکات پیش‌رونده، اشکال طبیعی و تعداد اسپرم‌ها در گروه دیابتی تیمارشده با عصاره چرخه در مقایسه با گروه شاهد دیابتی افزایش معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). میانگین وزن، طول و عرض بیضه، همچنین میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و میانگین ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز نیز در گروه دیابتی تیمارشده با عصاره چرخه در مقایسه با گروه شاهد دیابتی افزایش معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$).
نتیجه‌گیری: عصاره گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب بهبود پارامترهای اسپرمی، افزایش تعداد اسپرم و کاهش آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود.
کلیدواژه‌ها: دیابت، اسپرم، بیضه، موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۹
*نویسنده مسئول: damoon.Sadughi@gmail.com

مقدمه
بیماری دیابت، با سطوح بالای قند خون و اختلال در متابولیزم کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و پروتئین‌ها نمایان می‌شود و همچنین با فقدان مطلق یا نسبی انسولین همراه است. افزایش مزمن قند خون در درازمدت منجر به اختلالاتی چون نوروپاتی، نفروپاتی، رتینوپاتی و از همه مهم‌تر اختلال در رفتارهای جنسی و بافت تولیدمثلی می‌شود [۱]. این عوارض در بافت تولیدمثلی جنس نر به‌صورت کاهش تعداد اسپرم، کیفیت پایین مایع سمینال، کاهش هورمون تستوسترون و کاهش رده سلول‌های زایای اسپرم بروز می‌کند. علاوه بر این، شرایط غیرفیزیولوژیک نظیر ایسکمی، افزایش دما، تشعشعات الکترومغناطیسی و دیابت به‌عنوان عوامل محیطی القاکننده مرگ سلولی موجب فعال‌شدن آپوپتوز در رده سلول‌های زایای اسپرم می‌شود [۲]. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که بین شرایط استرس اکسیداتیو در مایع منی و نقص عملکرد اسپرماتوزوآ رابطه مستقیم وجود دارد. همچنین مشخص شده است دیابت منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در مایع منی می‌شود. مایع منی طبیعی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر آسکوربات، آلفا- توکوفرول و پیروات است که نقش حفاظت از اسپرماتوزوآ در برابر استرس اکسیداتیو را بر عهده دارند [۳]. در شرایط طبیعی ROS تولیدشده در مایع منی، به‌طور پیوسته توسط آنتی‌اکسیدان‌های مایع منی غیرفعال می‌شود. بنابراین یکی از دلایل ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و نقص عملکرد اسپرماتوزوآ ناشی از عدم تعادل بین تولید ROS و غیرفعال‌شدن آن توسط آنتی‌اکسیدان‌ها است [۴، ۵]. تحقیقات نشان می‌دهد شدت بیماری دیابت با افزایش تشکیل ROS رابطه مستقیم و با میزان تحرک اسپرم رابطه معکوس دارد. بدین صورت که هر چه دیابت شدیدتر باشد میزان ROS موجود در سیتوپلاسم اسپرماتوزوآ افزایش می‌یابد و در نتیجه موجب کاهش تحرک اسپرم می‌شود [۶]. این احتمال وجود دارد که افزایش تولید ROS، در نهایت سبب کاهش فسفوریلاسیون پروتئین‌های آکسونمی و عدم تحرک اسپرم شود. این حالت منجر به کاهش سیالیت غشا که به نوبه خود برای لقاح اسپرم و اووسیت لازم است، می‌شود [۷]. فرضیه دیگر این است که هیدروژن‌پراکساید (H_2O_2) از عرض غشا به داخل سلول انتشار می‌یابد و فعالیت بعضی آنزیم‌ها مانند گلوکز-۶-فسفات‌دهیدروژناز را مهار می‌کند. این آنزیم میزان انتقال گلوکز از طریق مسیر شنت-هگزوز- مونوفسفات را کنترل می‌کند که آن نیز به نوبه خود غلظت داخل سلولی NADPH را کنترل می‌نماید. NADPH به‌عنوان منبع الکترون برای تولید ROS توسط سیستم آنزیمی NADPHاکسیداز استفاده می‌شود. مهار گلوکز-۶-فسفات‌دهیدروژناز منجر به کاهش NADPH و تجمع گلوتاتیون اکسیده می‌شود که می‌تواند دفاع آنتی‌اکسیدانی اسپرماتوزوآ را

Archive of SID
www.SID.ir

کاهش و پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشا را افزایش دهد [۸]. فشرده‌بودن DNA و حضور آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی، DNA اسپرم را از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌نماید. در افراد دیابتی با توجه به اینکه DNA اسپرم در معرض غلظت بالای ROS قرار دارد موجب قطعه‌قطعه‌شدن آن می‌شود. همچنین یکی دیگر از دلایل ایجاد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در افراد دیابتی، پایین‌بودن سطح آنتی‌اکسیدان‌ها در مایع منی و تولید بیش از حد ROS در سیتوپلاسم اسپرم است [۹]. تحقیقات نشان داد دیابت موجب کاهش سطح هورمون تستوسترون، ناهنجاری ساختاری اسپرم، کاهش روند طبیعی اسپرماتوژنز و اسپرمیوژنز می‌شود. همچنین مشخص شد دیابت می‌تواند موجب القای مسیر سیگنالینگ آپوپتوز در سلول‌های اسپرمی و کاهش تعداد آنها شود [۱۰]. پژوهش‌های انجام‌شده در مردان دیابتی نشان داد علت اصلی کاهش باروری در این افراد کاهش در تعداد، قدرت تحرک و ایجاد مورفولوژی ناهنجار در اسپرم است. همچنین اکسیداسیون DNA اسپرم توسط رادیکال‌های آزاد در ایجاد ناباروری در افراد دیابتی نقش دارد [۱۱]. آنتی‌اکسیدان‌ها مواد بیوشیمیایی مهمی هستند که DNA را در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند. مشخص شده است گیاهان دارویی با دارابودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان می‌توانند با کاهش رادیکال‌های آزاد ناشی از دیابت موجب بهبود آسیب‌های وارده به اسپرم‌ها و بافت بیضه شوند [۱۲].

چرخه (*Launaea acanthodes (Boiss.) O. Kuntze*) از خانواده *آستراسه‌آ* (*Asteraceae*) که به نام‌های چرخان، چرخک یا شکرلوله نیز شناخته می‌شود، گیاهی است چندساله، بوته‌ای و بیابانی با شاخک‌های انبوه، ساقه‌ای بدون کرک، منشعب و شیرابه‌ای سفیدرنگ که در اثر ماندن، حالت شیشه‌ای و رنگ زرد پیدا می‌کند. این گیاه با نام بومی مقل و ملک‌ازرق در نقاط خشک و بیابانی ایران از جمله استان‌های مرکزی نظیر یزد، اصفهان، سمنان، تهران، قم، کرمان و خراسان می‌روید. ساقه این گیاه در بین اهالی مناطق کویری به‌عنوان یک داروی گیاهی موثر در درمان بسیاری از بیماری‌ها نظیر صرع، ناراحتی عصبی، دردهای موضعی و مفصلی، اختلالات معده‌ای- روده‌ای، دیابت و کاهش قند خون استفاده می‌شود [۱۳]. در عصاره این گیاه ترکیباتی از قبیل فلاونوئید، ترپنوئید، ساپونین، آلکالوئید، تانن، پلی‌ساکارید و منوساکاریدهایی نظیر آرابینوز، مانوز و مشتقات اسیدگلکورونیک نیز شناسایی شده است [۱۴]. از عصاره ساقه گیاه چرخه ترکیبات فلاونوئیدی تخلیص شده است. با توجه به اینکه فلاونوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قادر به کاهش سطح رادیکال‌های آزاد سلولی هستند می‌توان از آنها در کاهش اثرات مخرب دیابت استفاده نمود [۱۵]. مروری بر منابع نشان داد که تاکنون مطالعه‌ای روی اثر تزریق داخل‌صفاقی عصاره گیاه چرخه بر بهبود آسیب‌های اسپرمی ناشی از دیابت صورت نگرفته است.

بنابراین این پژوهش با هدف بررسی اثر عصاره آبی گیاه چرخه بر پارامترهای اسپرمی و تغییرات هیستولوژیک بافت بیضه در موش‌های صحرایی دیابتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی که در آزمایشگاه تحقیقات جانوری گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور در سال ۱۳۹۳ انجام شد، ۲۷ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۲۰ هفته و با وزن تقریبی ۱۶±۱۴۸گرم مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در دمای تقریبی ۲۵°C-۲۳، رطوبت نسبی ۳۵-۳۰٪ و دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ساعته نگهداری شدند. حیوانات در قفس‌های استاندارد قرار داشتند و آب به‌مقدار کافی توسط بطری شیشه‌ای در اختیار آنها قرار داده شد و از کنسانتره‌های خوراکی استاندارد تغذیه نمودند. به‌منظور حصول حالت سازش با محیط، تمامی آزمایش‌ها پس از گذشت حداقل ۱۰ روز از استقرار حیوانات به‌انجام رسید [۱۶]. رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود. همچنین در کلیه مراحل، قوانین و مقررات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد.

موش‌های صحرایی مورد مطالعه به‌طور تصادفی به ۳ گروه ۹تایی شامل؛ گروه شاهد سالم، گروه شاهد دیابتی و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره تقسیم شدند. نمونه‌های گروه شاهد سالم به‌مدت یک ماه به‌صورت یک روز در میان به‌روش داخل‌صفاقی آب مقطر استریل دریافت نمودند. این عمل به‌منظور یکسان‌نمودن شوک حاصل از تزریق انجام گرفت. گروه شاهد دیابتی نیز پس از ایجاد دیابت تجربی به‌مدت یک ماه به‌صورت یک روز در میان به‌روش داخل‌صفاقی آب مقطر استریل دریافت نمودند. گروه دیابتی تحت تیمار پس از ایجاد دیابت تجربی به‌مدت یک ماه به‌صورت یک روز در میان عصاره آبی گیاه چرخه را با غلظت ۳۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌صورت داخل‌صفاقی دریافت نمودند.

روش جمع‌آوری گیاه چرخه و عصاره‌گیری: اندام هوایی گیاه چرخه در حد فاصل جاده مشهد به نیشابور در موقعیت جغرافیایی ۳۵ تا ۳۶درجه طول شمالی و ۵۸ تا ۵۹درجه عرض شمالی به مساحت حدود ۷هکتار جمع‌آوری شد. حداقل و حداکثر ارتفاع مناطق به‌ترتیب ۱۲۵۸ و ۱۴۸۲متر از سطح دریا است. نمونه‌های گیاهی پس از جمع‌آوری، توسط کارشناسان محترم هرباریوم دانشکده علوم دانشگاه پیام نور شناسایی و تایید شدند. عصاره‌گیری به‌روش سوکسله انجام گرفت. بدین صورت که ۵۰ گرم پودر خشک‌شده اندام هوایی گیاه چرخه با ۴۰۰میلی‌لیتر آب مقطر توسط هیتر برقی به‌مدت ۱۰ساعت جوشانده شد. سپس با حذف حلال در دمای ۴۰°C عصاره تام استخراج شد. عصاره پس از حذف حلال و خشک‌کردن، با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به

Archive of SID
www.SID.ir

حیوان تزریق شد. قبل از تزریق، محلول تهیه‌شده از فیلتر ۰/۲میکرومتر عبور داده و استریل شد [۱۶].

روش ایجاد هیپرگلیسمی تجربی: مدل تجربی دیابت (دیابت وابسته به انسولین) در موش صحرایی با یک بار تزریق داخل‌صفاقی آلوکسان‌مونوهیدرات (سیگما- آلدریچ؛ آلمان) به‌میزان ۳۶۰میلی‌گرم بر کیلوگرم ایجاد شد. همچنین از آب مقطر استریل به‌عنوان حلال آلوکسان استفاده شد. تزریق آلوکسان به گروه شاهد دیابتی و گروه دیابتی تحت تیمار با عصاره صورت گرفت. با این روش ۷۲ ساعت بعد از تزریق، دیابت تجربی در نمونه‌ها ایجاد شد که به‌منظور تایید آن خونگیری از ورید دمی صورت گرفت. قند خون توسط دستگاه گلوکومتر (EasyGluco؛ کره) اندازه‌گیری شد و قند خون بالای ۳۰۰میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی‌شدن در نظر گرفته شد. دیابتی‌شدن و ایجاد قند خون بالای ۳۰۰میلی‌گرم بر دسی‌لیتر در موش‌های صحرایی، روز صفر آزمایش در نظر گرفته شد و پس از آن تمام تزریقات به‌مدت یک ماه به‌صورت یک روز در میان صورت گرفت [۱۶].

بررسی پارامترهای اسپرمی: در تمام گروه‌ها در روز ۳۰ آزمایش، موش‌های صحرایی توسط استنشاق دی‌اتیل‌اتر (مرک؛ آلمان) در محیط بسته کشته شدند و بیضه آنها به‌منظور بررسی پارامترهای اسپرمی استخراج شد. بلافاصله پس از کشتن موش‌ها، اپیدیدیم از بیضه جدا شده و با قیچی استریل به قطعات کوچک تقسیم شد و با ۲میلی‌لیتر محلول نرمال سالین شستشو داده شد. سپس برای خروج اسپرم‌ها از لوله‌های اپیدیدیم، به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. اسپرم‌های هر سه گروه برای بررسی حرکات پیش‌رونده (FPM)، تعداد و مورفولوژی اسپرم بررسی شدند [۱۷].

حرکات پیش‌رونده اسپرم‌ها به‌صورت حرکات پیش‌رونده سریع، حرکات پیش‌رونده کند یا آهسته و عدم تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت. بر این اساس ۲۰ میکرولیتر از مایع به‌دست‌آمده از اپیدیدیم با ۲ میلی‌لیتر نرمال سالین رقیق شده و یک قطره از محلول رقیق‌شده روی لام قرار گرفت و در زیر میکروسکوپ نوری (Olympus CX21FS1؛ ژاپن) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰برابر بررسی شد. تخمین درصد حرکت اسپرم‌ها براساس مشاهده حرکات در چهار نقطه متفاوت از لام با شمارش حداقل ۵۰ اسپرم توسط فردی که نسبت به گروه‌های شاهد و مداخله بی‌اطلاع بود، انجام شد.

برای مطالعه تعداد اسپرم از لام هموسایتومتر نئوبار استفاده شد. قبل از مطالعه، سوسپانسیون اسپرم به نسبت یک به یک با فرمالدئید ۱۰٪ رقیق شد تا اسپرم‌ها برای شمارش به‌طور کامل بی‌حرکت شوند. میزان ۱۰میلی‌لیتر از محلول رقیق‌شده روی لام نئوبار قرار داده شد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰برابر مورد بررسی قرار گرفت. اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی و غیرطبیعی شمارش شدند. پس از شمارش، تعداد آنها در یک میلی‌لیتر حجم نمونه محاسبه شد.

برای بررسی مورفولوژی، ابتدا یک قطره از سوسپانسیون اسپرم روی لام شیشه‌ای گسترده شد و پس از خشک‌شدن توسط تریپان‌بلو رنگ‌آمیزی شد. درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی و غیرطبیعی در هر نمونه (حداقل ۱۰۰ اسپرم با هر مورفولوژی) مورد بررسی قرار گرفت. طبقه‌بندی مورفولوژی اسپرم‌ها به‌صورت زیر بود؛ ۱) طبیعی: اسپرم‌هایی که در ناحیه سر، گردن و دم مشکلی از نظر ظاهری نداشتند. ۲) اشکال غیرطبیعی سر: اسپرم‌های دارای سر کوچک و بزرگ‌تر از اندازه طبیعی یا سرهایی که از بخش‌های دیگر جدا باشد. ۳) اشکال غیرطبیعی گردن: اسپرم‌هایی که بین ناحیه سر و گردن زاویه‌ای ایجاد شده باشد یا اسپرم‌هایی که در ناحیه گردن برآمدگی ایجاد شده باشد. ۴) اشکال غیرطبیعی دم: اسپرم‌هایی که دمشان کوتاه‌تر از حالت طبیعی، پیچ‌خورده و غیرطبیعی باشد.

بررسی هیستولوژیک بافت بیضه: در روز ۳۰ آزمایش، بیضه‌ها پس از خارج‌شدن و اندازه‌گیری وزن و ابعاد، برای فیکس‌شدن به فرمالدئید ۱۰٪ (مرک؛ آلمان) انتقال یافتند. پس از انجام مراحل پردازش بافتی، مقطع‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه و به‌روش هماتوکسیلین- ائوزین رنگ‌آمیزی شد. سپس تصاویری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ برابر تهیه شد. از هر مقطع ۱۵ لوله منی‌ساز با قطر تقریباً گرد به‌صورت تصادفی انتخاب شد و میانگین ضخامت اپیتلیوم (۴ نقطه در هر لوله منی‌ساز به‌صورت تصادفی) در هر ۱۵ لوله مورد بررسی قرار گرفت و از میانگین ضخامت لوله‌ها متوسط به‌دست آمد. سپس میانگین دو قطر عمود بر هم در هر یک از ۱۵ لوله منی‌ساز محاسبه شد و از میانگین قطر لوله‌ها متوسط به‌دست آمد. اندازه‌گیری میانگین قطر لوله منی‌ساز و میانگین ضخامت اپیتلیوم در هر بیضه چهار بار تکرار و از داده‌ها متوسط به‌دست آمد. اندازه‌گیری میانگین قطر لوله منی‌ساز و میانگین ضخامت اپیتلیوم در تصاویر تهیه‌شده توسط نرم‌افزار Image J 2 بررسی شد [۱۸].

تحلیل اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS 20 و براساس آنالیز واریانس ناپارامتری کروسکال‌والیس انجام شد و برای مقایسه دو به دوی گروه‌ها، آزمون تعقیبی دان مورد استفاده قرار گرفت. معیار استنتاج آماری $p<۰/۰۵$ بود.

یافته‌ها

میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکات سریع (p=۰/۰۰۹) و آهسته (p=۰/۰۰۲) در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش و میانگین درصد اسپرم‌های بدون تحرک (p=۰/۰۰۱) در این گروه در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکات سریع و آهسته در گروه تجربی تیمارشده با عصاره گیاه

www.SID.ir
Archive of SID

چرخه با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد سالم کاهش یافت که این کاهش در حرکات سریع معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۸)، ولی در حرکات آهسته معنی‌دار نبود (p=۰/۰۵۸). میانگین درصد اسپرم‌های دارای حرکات سریع (p=۰/۰۱۶) و آهسته (p=۰/۰۲۱) در گروه تجربی تیمارشده با عصاره گیاه چرخه در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین میانگین درصد اسپرم‌های بدون تحرک در گروه تجربی تیمارشده با عصاره گیاه چرخه در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد (p=۰/۰۱۲)، ولی نسبت به گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری کاهش داشت (p=۰/۰۰۲).

درصد اشکال طبیعی اسپرم در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p=۰/۰۰۱). همچنین درصد اشکال طبیعی اسپرم در گروه تجربی تیمارشده با عصاره چرخه در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p=۰/۰۱۵) ولی در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد (p=۰/۰۰۲). درصد اشکال غیرطبیعی سر (p=۰/۰۰۱)، گردن (p=۰/۰۱۱) و دم اسپرم (p=۰/۰۰۲) در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. درصد اشکال غیرطبیعی سر، گردن و دم اسپرم در گروه تجربی تیمارشده با عصاره چرخه در مقایسه با گروه شاهد سالم نیز افزایش یافت. این افزایش برای اشکال غیرطبیعی سر (p=۰/۰۱۴) و دم (p=۰/۰۰۸) معنی‌دار بود، ولی برای اشکال غیرطبیعی گردن معنی‌دار نبود (p=۰/۰۶۱). درصد اشکال غیرطبیعی سر (p=۰/۰۰۱)، گردن (p=۰/۰۰۷) و دم اسپرم (p=۰/۰۰۳) در گروه تجربی تیمارشده با عصاره چرخه در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد (جدول ۱؛ شکل ۱).

تعداد اسپرم ($\times 10^6$) در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (p=۰/۰۰۱). همچنین تعداد اسپرم در گروه تجربی تیمارشده با عصاره چرخه در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش داشت (p=۰/۰۰۵)، ولی در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (p=۰/۰۰۲؛ جدول ۱).

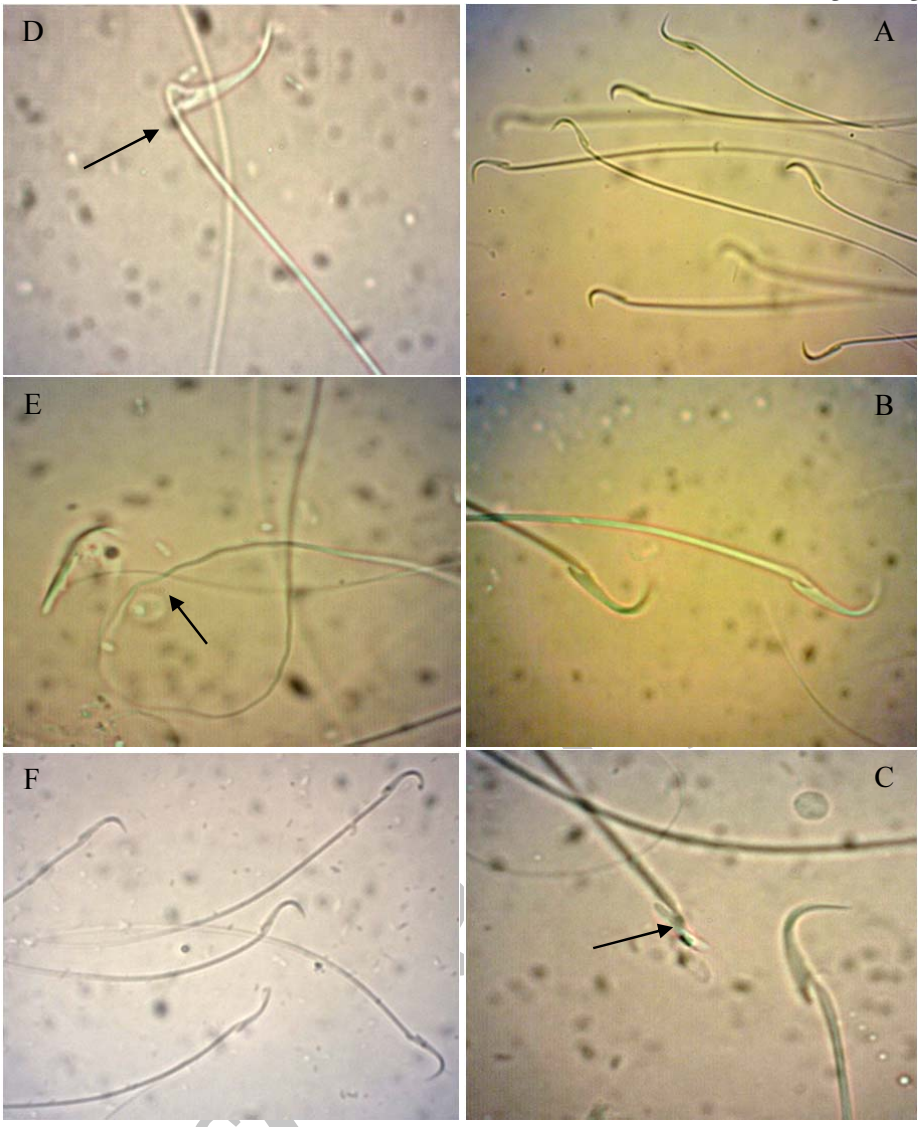
میانگین وزن بیضه (p=۰/۰۰۴)، طول بیضه (p=۰/۰۰۳)، عرض بیضه (p=۰/۰۰۹)، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (p=۰/۰۰۱) و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز (p=۰/۰۱۱) در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. میانگین وزن بیضه (p=۰/۰۰۴)، طول بیضه (p=۰/۰۱۶)، عرض بیضه (p=۰/۰۱۸)، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (p=۰/۰۰۶) و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز (p=۰/۰۱۵) در گروه تجربی تیمارشده با عصاره چرخه در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد، ولی در مقایسه با گروه شاهد دیابتی میانگین وزن بیضه (p=۰/۰۰۷)، طول بیضه (p=۰/۰۰۲)، عرض بیضه (p=۰/۰۱۱)، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (p=۰/۰۰۱) و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز (p=۰/۰۰۲) به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد (جدول ۱؛ شکل ۲).

جدول ۱) مقایسه میانگین پارامترهای اسپرم و بیضه موش‌های صحرایی به‌تفکیک گروه

پارامترها	شاهد سالم	شاهد دیابتی	تیمار با چرخه
میانگین درصد حرکات پیش‌رونده اسپرم			
سریع	۵۲/۶۸±۴/۲۱	^{a}۸/۶۷±۴/۶۱	^{bc}۳۲/۴۱±۵/۱۲
آهسته	۲۸/۳۶±۳/۰۲	^{a}۱۱/۲۴±۲/۲۵	^{c}۲۴/۸۶±۲/۶۸
بدون تحرک	۱۸/۹۶±۶/۸۲	^{a}۸۰/۰۹±۷/۷۵	^{bc}۴۲/۷۳±۵/۸۸
میانگین درصد اشکال طبیعی و غیرطبیعی اسپرم			
طبیعی	۹۲/۲۸±۲/۴۸	^{a}۲۳/۴۳±۲/۸۵	^{bc}۶۸/۹۳±۳/۳۷
سر غیرطبیعی	۲/۶۴±۰/۰۶	^{a}۳۵/۶۸±۰/۰۸	^{bc}۱۲/۲۸±۱/۸۷
گردن غیرطبیعی	۴/۲۱±۰/۱۱	^{a}۱۲/۴۸±۰/۸۴	^{c}۶/۸۱±۰/۱۸
دم غیرطبیعی	۰/۸۷±۰/۰۹	^{a}۲۸/۴۱±۰/۹۲	^{bc}۱۱/۹۸±۰/۶۳
میانگین تعداد اسپرم			
$\times 10^6$ (میلیون در هر میلی‌لیتر)	۱۲/۰۴±۱/۰۱	^{a}۲/۷۳±۰/۳۱	^{bc}۷/۳۸±۰/۵۱
میانگین پارامترهای بیضه			
وزن (گرم)	۱/۸۶±۰/۰۷	^{a}۰/۸۷±۰/۰۴	^{bc}۱/۳۳±۰/۰۶
طول (سانتی‌متر)	۱/۹۸±۰/۰۵	^{a}۱/۰۲±۰/۰۳	^{bc}۱/۷۳±۰/۰۲
عرض (سانتی‌متر)	۱/۲۱±۰/۰۶	^{a}۰/۶۸±۰/۰۴	^{bc}۰/۹۸±۰/۰۹
قطر لوله‌های اسپرم‌ساز (میکرون)	۳۱۸/۴۸±۱۸/۹۴	^{a}۱۴۶/۵۱±۱۱/۷۳	^{bc}۲۸۷/۱۵±۱۴/۳۸
ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز (میکرون)	۱۰۸/۳۵±۵/۵۷	^{a}۴۵/۳۳±۷/۸۴	^{bc}۸۲/۲۶±۴/۸۶

a: اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های شاهد دیابتی و شاهد سالم؛ b: اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تجربی و شاهد سالم؛ c: اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های تجربی و شاهد دیابتی

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱) A: گروه شاهد سالم (اشکال طبیعی اسپرم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰برابر). B: گروه شاهد سالم (اشکال طبیعی اسپرم با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰برابر). C: گروه شاهد دیابتی (اسپرم با سر غیرطبیعی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰برابر). D: گروه شاهد دیابتی (اسپرم با گردن غیرطبیعی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰برابر). E: گروه شاهد دیابتی (اسپرم با دم غیرطبیعی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰برابر). F: گروه دیابتی تیمارشده با عصاره گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (اشکال طبیعی اسپرم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰برابر). فلش نشان‌دهنده ناحیه آسیب‌دیده اسپرم است.

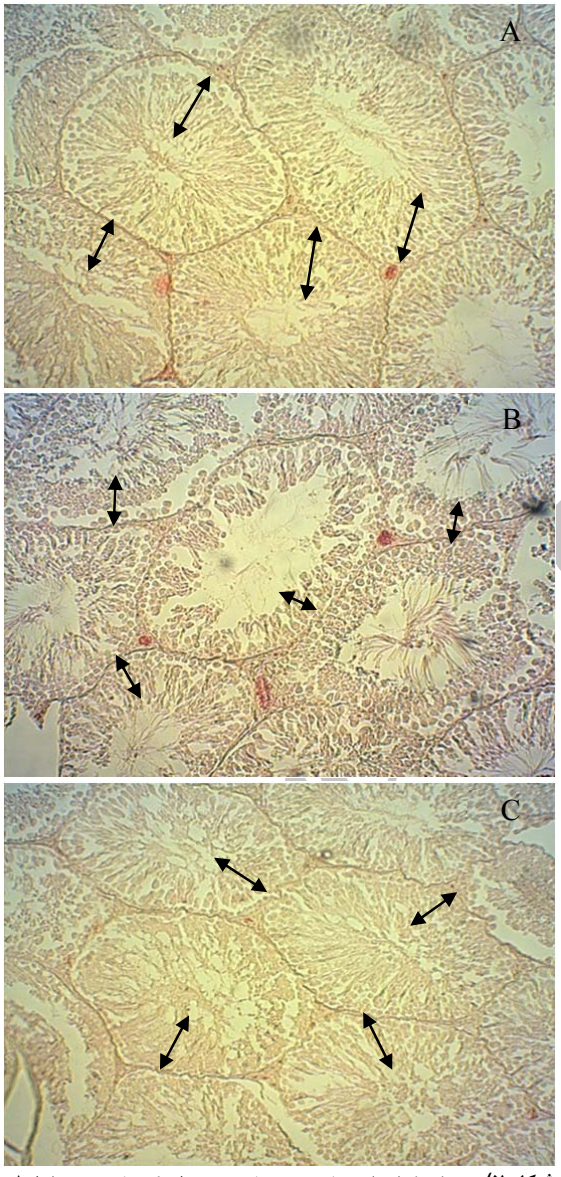
بحث

در پژوهش حاضر، اثر عصاره گیاه چرخه در بهبود پارامترهای اسپرمی و تغییرات هیستولوژیک بافت بیضه در موش‌های صحرایی دیابتی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست‌آمده، عصاره گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم توانست میانگین درصد حرکات پیش‌رونده اسپرم (سریع، آهسته و بدون تحرک) را نسبت به نمونه‌های گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. همچنین میانگین تعداد و درصد اشکال طبیعی اسپرم در گروه تجربی تیمارشده با عصاره گیاه چرخه در مقایسه با گروه شاهد دیابتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با توجه به اینکه موش‌های گروه تجربی تیمارشده با عصاره گیاه چرخه و گروه شاهد دیابتی تماماً توسط آلوکسان دیابتی شده‌اند، می‌توان بهبودی در پارامترهای اسپرم، افزایش تعداد اسپرم و کاهش اشکال غیرطبیعی اسپرم در گروه تجربی تیمارشده با عصاره گیاه چرخه را به ترکیبات موثر موجود در عصاره این گیاه نسبت داد. تاکنون مطالعه‌ای به‌صورت مستقیم روی اثرات عصاره گیاه چرخه در بهبود پارامترهای اسپرم و تغییرات هیستولوژیک بافت بیضه در نمونه‌های دیابتی انجام نشده است، ولی در پژوهشی مشخص شد عصاره آبی الکلی گیاه چرخه دارای اثرات هیپوگلیسمیک قدرتمندی است و ترکیبات موثر موجود در عصاره احتمالاً از طریق تحریک یا تشدید هیپرپلازی یا هیپرتروفی در سلول‌های بتای باقی‌مانده، موجب افزایش سطح انسولین خون و کاهش سطح قند خون نمونه‌های دیابتی می‌شود

www.SID.ir

[۱۹]. دیابت و افزایش سطح سرمی قند خون موجب افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و منجر به افزایش استرس اکسیداتیو سلولی می‌شود [۲]. از آنجایی که استرس اکسیداتیو با تغییر در فیزیولوژی طبیعی غشاهای سلولی منجر به مرگ سلول‌های زایا در مراحل مختلف نمو و همچنین موجب کاهش تعداد اسپرم‌ها می‌شود، آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند از اسپرم در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد محافظت کنند و کیفیت اسپرم را بهبود بخشند [۲۰]. گیاه چرخه دارای ترکیبات فلاونوئیدی است. مشخص شده است این ماده دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی است [۱۵]. در پژوهشی مشخص شد تیمار آنتی‌اکسیدانی موجب افزایش محافظت در مقابل رادیکال‌های آزاد، بهبود پارامترهای اسپرمی و کاهش آسیب سلول‌های اسپرم توسط رادیکال‌های آزاد می‌شود. در نتیجه، گزارش شد آنتی‌اکسیدان‌ها از آسیب سلول‌های اسپرم توسط رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند و پارامترهای اسپرمی را بهبود می‌بخشند [۲۱]. مطالعات نشان داده‌اند درصد اسپرم‌های با آسیب در DNA و اشکال غیرطبیعی در افراد دیابتی در مقایسه با افراد سالم به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. همچنین گزارش شد اگر بیش از ۳۰٪ اسپرم‌ها دارای اشکال غیرطبیعی باشند نمونه نابارور محسوب می‌شود [۱۲]. براساس نتایج به‌دست‌آمده، میانگین تعداد و درصد اشکال طبیعی سر، گردن و دم اسپرم در نمونه‌های دیابتی تیمارشده با عصاره گیاه چرخه در مقایسه با نمونه‌های شاهد دیابتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. گزارش شده است آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان با کاهش رادیکال‌های آزاد و کاهش استرس اکسیداتیو در موش‌های دیابتی می‌توانند منجر به افزایش اسپرماتوژنز و در نهایت موجب افزایش تعداد اسپرم شوند [۲۲].

عصاره گیاه چرخه توانست در بهبود بافت بیضه از طریق کاهش تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی، افزایش تعداد اسپرم و افزایش ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز موثر واقع شود. تحقیقات نشان داد دیابت از طریق ایجاد آپوپتوزیس، آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز، کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش مجموعه سلولی اسپرماتوژنز موجب تغییر بافت بیضه می‌شود [۱۱]. در پژوهش حاضر، تعداد اسپرم در گروه شاهد دیابتی در مقایسه با گروه شاهد سالم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در صورتی که در گروه تیمارشده با عصاره گیاه چرخه، افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم در مقایسه با گروه شاهد دیابتی مشاهده شد. تفسیر این نتایج می‌تواند بدین صورت باشد که ترکیبات موجود در عصاره گیاه چرخه احتمالاً می‌تواند با کاهش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت موجب افزایش فرآیند اسپرماتوژنز شود و بر سلامتی کلی اسپرم و کاهش اشکال غیرطبیعی آن در موش‌های دیابتی اثر بگذارد. براساس مطالعات هیستولوژیکی، کاهش معنی‌داری در تعداد اسپرم و میانگین قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد دیابتی مشاهده شد. با توجه به اینکه آتروفی لوله‌های منی‌ساز نیز نشانه اختلال در اسپرماتوژنز و تغییرات مورفولوژیک در بافت بیضه است [۲۳] و نیز ارتباط مثبتی بین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز، فعالیت اسپرماتوژنز و تعداد اسپرم وجود دارد، کاهش معنی‌دار در تعداد اسپرم، میانگین قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه شاهد دیابتی کاملاً طبیعی به‌نظر می‌رسد. در حالی که در گروه تیمارشده با عصاره گیاه چرخه افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم، میانگین قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده شد.



شکل ۲) فتومیکروگراف از مقطع عرضی بافت بیضه (بزرگ‌نمایی ۱۰۰برابر) A: گروه شاهد سالم؛ B: گروه شاهد دیابتی؛ C: گروه دیابتی تیمارشده با عصاره چرخه با غلظت ۳۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم. در تصاویر فوق، فلش‌ها نشان‌دهنده قطر اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز است. همان طور که مشاهده می‌شود بیشترین قطر اپیتلیوم مربوط به نمونه‌های گروه شاهد سالم و گروه تجربی تیمارشده با عصاره چرخه است.

www.SID.ir

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به تاثیر عوامل مختلف فیزیولوژیک و محیطی که بر سیستم‌های زنده حاکم است و همچنین عدم دسترسی به امکانات مورد نیاز برای تعیین دقیق ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده عصاره چرخه اشاره نمود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت افزایش معنی‌دار در تعداد اسپرم، میانگین قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز نشان‌دهنده اثرات مثبت عصاره گیاه چرخه بر بافت بیضه است. از آنجا که روشن‌شدن مکانیزم عمل ترکیبات موثر عصاره گیاه چرخه در بهبود پارامترهای اسپرمی و بافت بیضه در نمونه‌های دیابتی نیاز به تحقیقات گسترده‌ای دارد، پیشنهاد می‌شود بررسی‌های سیتولوژیکی بیشتری در این زمینه انجام گیرد. همچنین با توجه به اینکه در پژوهش حاضر از عصاره تام گیاه چرخه استفاده شده است، می‌توان با جداسازی ترکیبات عصاره گیاه چرخه و انجام مجدد مراحل آزمایش، ترکیباتی را که اثرات مثبتی بر کاهش عوارض ناشی از دیابت در اسپرم و بافت بیضه اعمال می‌کنند، به‌دست آورد. همچنین می‌توان اثرات غلظت‌های متفاوت عصاره گیاه چرخه را بر سطح سرمی قند خون و هورمون‌های انسولین و تستوسترون بررسی نمود. اگر عصاره گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌داری در سطح سرمی قند خون و افزایش معنی‌داری در سطح سرمی هورمون‌های انسولین و تستوسترون در مقایسه با شاهد دیابتی شود می‌تواند تکمیل و تاییدکننده نتایج حاصل از پژوهش حاضر باشد.

نتیجه‌گیری

عصاره گیاه چرخه با غلظت ۳۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند با تاثیر بر بافت بیضه موجب کاهش آتروفی لوله‌های اسپرم‌ساز در موش‌های صحرایی دیابتی شود و با بهبود پارامترهای اسپرمی و افزایش تعداد اسپرم، عوارض ناشی از دیابت در اسپرم و بافت بیضه را کاهش دهد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری گروه زیست‌شناسی و کشاورزی دانشگاه پیام نور در انجام این پروژه تحقیقاتی ابراز می‌نمایند.

تاییدیه اخلاقی: رعایت تمامی حقوق حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش برای استفاده انسانی مبتنی بر دستورالعمل‌های بین‌المللی مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی بود.

تعارض منافع: موردی از طرف نویسندگان بیان نشده است.

منابع مالی: منابع مالی این پژوهش توسط دانشگاه پیام نور تامین شده است.

منابع

1- Hinman RM, Smith MJ, Cambier JC. B cells and type 1 diabetes …in mice and men. Immunology Lett. 2014;16(2):128-32.

2- Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. Biochimica Biophysica Acta. 2014;1840(9):2709-29.

3- Fanaei H, Keshtgar S, Bahmanpour S, Ghannadi A, Kazeroni M. Beneficial effects of α-tocopherol against intracellular calcium overload in human sperm. Reprod Sci. 2011;18(10):978-82.

4- Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: An overview. Asian J Androl. 2011;13(5):690-7.

5- Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. Clin Chem Lab Med. 2011;49(11):1773-82.

6- Cui X. Reactive oxygen species: The achilles' heel of cancer cells? Antioxid Redox Signal. 2012;16(11):1212-4.

7- Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. J Androl. 2002;23(6):737-52.

8- Tvrdá E, Kňažická Z, Bárdos L, Massányi P, Lukáč N. Impact of oxidative stress on male fertility - a review. Acta Vet Hung. 2011;59(4):465-84.

9- Ford WC. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. Hum Reprod Update. 2004;10(5):387-99.

10- Roessner C, Paasch U, Kratzsch J, Glander H, Grunewald S. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. Reprod Biomed Online. 2012;25(3):292-9.

11- Kilarkaje N, Al-Hussaini H, Al-Bader MM. Diabetes-induced DNA damage and apoptosis are associated with poly (ADP ribose) polymerase 1 inhibition in the rat testis. Eur J Pharmacol. 2014;737:29-40.

12- Yun JI, Gong SP, Song YH, Lee ST. Effects of combined antioxidant supplementation on human sperm motility and morphology during sperm manipulation in vitro. Fertil Sterility. 2013;100(2):373-8.

13- Hajinejad Boshroue R, Behnam Rassouli M, Tehranipour M, Gheybi F, Hajinejad Sh, Elahi Moghadam Z. The effects of hydro-alcoholic extract of launaea acanthodes on the blood, urine albumin and bilirubin levels in male hyperglycemic wistar rat. Iranian J Endocrinol Metabolism. 2013;15(2):190-6. [Persian]

14- Piazza L, Bertini S, Milany J. Extraction and structural characterization of the polysaccharide fraction of Launaea acanthodes gum. Carbohydr Polymers. 2010;79(2):449-54.

15- Karimidokht Shahrbabaki A, Oryan Sh, Parivar K. Anticonvulsant activity of ethanolic extract and aqueous fraction of Launaea acanthodes gum in comparison with diazepam in mice. J Qazvin Univ Med Sci. 2009;13(1):14-20. [Persian]

16- Sadooghi SD, Nezhad Shahrokh Abadi Kh, Zafar Balanzhad S, Baharara J. Investigating the cytotoxic effect of ethanolic extract of Ferula assa-foetida resin on HepG2 cell line. Feyz. 2013;17(4):323-30. [Persian]

17- Kheradmand A. Improvement of sperm evaluation parameters following ghrelin treatment in cadmium-induced testicular injury in rats. J Isfahan Med Sch. 2014;31(265):2053-62. [Persian]

18- Tajaddini Sh, Ebrahimi S, Shirinbayan P, Bakhtiyari M, Behnam B, Joghataei MT, et al. Protective effects of manganese on the testis structure and sperm parameters of formalin-treated mice. J Isfahan Med Sch. 2013;31(243):1018-32. [Persian]

19- Behnam-Rassouli M, Ghayour N, Ghayour MM, Ejtehadi MM. Investigating the effects of hydro-alcoholic extract of Launaea acanthodes on the serum levels of

Archive of SID
www.SID.ir

glucose, insulin, lipids and lipoproteins in stereptozotocin induced type I diabetic rats. Arak Med Univ J. 2012;14(6):48-56. [Persian]
20- Yousef MI. Protective role of ascorbic acid to enhance reproductive performance of male rabbits treated with stannous chloride. Toxicol. 2005;207(1):81-9.
21- Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. Clin Biochemistry. 2011;44(4):319-24.
22- Zhong RZh, Zhou DW. Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. J Integr Agric. 2013;12(10):1826-38.
23- Stefanović A, Kotur-Stevuljević J, Spasić S, Bogavac-Stanojević N, Bujisić N. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. Diabetes Res Clin Pract. 2008;79(1):156-63.

Archive of SID

www.SID.ir