



# بررسی اثر درمانی تیامین بر ساختار هیستومورفومتريک بيضه متعاقب مسموميت با سرب در مدل موش

رحمت‌اله فتاحیان دهکردی<sup>۱\*</sup>، ثریا خسروی‌ان دهکردی<sup>۲</sup>، ابوالفضل عالی<sup>۳</sup>

۱. استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد فلاورجان، فلاورجان-ایران.

۳. دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد-ایران.

پذیرش: ۱۲ اردیبهشت ماه ۹۵

دریافت: ۱۷ اسفندماه ۹۳

## چکیده

برخی پژوهش‌ها اثر تیامین بر بافت بیضه - به دنبال ایجاد مسمومیت با سرب- را گزارش کرده‌اند، اما تاکنون اثر آن بر ساختار مورفومتريک بیضه در موش‌هایی که سرب دریافت کرده‌اند را بررسی نکرده‌اند؛ لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر تیامین بر ساختار مورفولوژیک لوله‌های اسپرم‌ساز در موش‌های آلوده به سرب انجام شد. این مطالعه تجربی بر روی ۴۰ موش ویستار انجام گرفت. موش‌ها به طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی شامل گروه‌های A (کنترل)، B (دریافت‌کننده تیامین)، C (دریافت‌کننده سرب) و D (درمان شده با تیامین و سرب) تقسیم شدند. سرب به مقدار ۸/۵ میلی‌گرم در لیتر و مکمل تیامین به مقدار ۳۰ میلی‌گرم در لیتر به صورت گاوژ هر روز به موش‌ها خوراند. نمونه‌های بافتی به روش روتین بافت‌شناسی تهیه و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه اطلاعات مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. القای سرب سبب بهم ریختگی در ساختار مورفولوژیک لوله‌های اسپرم‌ساز از جمله رده‌های سلولی اسپرم‌ساز نسبت به گروه A و B گردید و استفاده از مکمل تیامین این تغییرات ایجاد شده را تا حدی کاهش داد. قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و ضخامت لایه‌ی پوششی زایای تناسلی لوله‌ها کاهش معنی‌داری را در گروه سرب نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.05$ ), در حالیکه روند بهبود این پارامترها در گروه D نسبت به گروه A مشاهده گردید. در معرض قرار گرفتن با سرب اثرات مضر بر روند اسپرماتوزن داشته، اما تجویز تیامین می‌تواند موجب بهبود کمیت و کیفیت پارامترهای مورفولوژیک بیضه شود.

**واژه‌های کلیدی:** موش، سرب، تیامین، هیستوپاتولوژی.

## مقدمه

با ترکیبات مختلفی که وابسته به عادات اجتماعی، شرایط زندگی، سختی کار و یا استفاده از داروها هستند، ارتباط داشته‌اند (۳، ۶ و ۹). اگرچه بیشتر پژوهش‌ها اثرات سمیت و کارسینوزن بودن فلزات سنگین را در انسان و حیوانات گزارش کرده‌اند، لیکن مشخص گردیده است که این فلزات نقش حیاتی در عملکرد بیولوژی طبیعی سلول‌ها داشته باشند. بیشتر فلزات سنگین مسموم کننده‌ی کلاسیک ساختار بیضه‌ای دارند، اگرچه مکانیسم عمل آن‌ها ممکن است از همدیگر متفاوت باشد (۱۵). سرب مسموم کننده

بشر در طول زندگی خود در معرض انواع مختلفی از آلوده‌کننده‌های محیطی قرار می‌گیرد. در سال‌های اخیر، نگرانی‌ها در مورد اثرات زیان‌بار مواد شیمیایی بر روند رشد و تکامل سیستم تولید مثلی افزایش یافته است. نارسایی‌های تکاملی گنادها ارتباط زیادی با قرارگیری در معرض فلزات سنگین دارد. در طی آبستنی با نارسایی‌های تکاملی گنادها ارتباط زیادی دارد. فلزات سنگین می‌توانند به‌عنوان مسموم کننده‌های دستگاه تناسلی عمل کنند و





مورفولوژیک در روند اسپرماتوژنز ناشی از مسمومیت با سرب و اثر محافظتی تیامین در موش منتشر نشده است، بنابراین هدف از این پژوهش بررسی این تغییرات در ارتباط با در معرض قرار گرفتن با سرب در بیضه موش است.

### مواد و روش کار

در این مطالعه تجربی از تعداد ۴۰ سر موش صحرایی از نژاد ویستار (*Rattus norvegicus albinus*) حدود ۱/۵ ماه سن و وزنی حدود  $210 \pm 35$  گرم، استفاده شد. حیوانات در قفس‌های جداگانه در اتاقی با سیکل نوری ۱۲ ساعت نور-۱۲ ساعت تاریکی و دمای محدود شده  $20 \pm 1$  درجه نگهداری شدند و اجازه داده شد که به آب و غذای جوندگان به شکل پلت‌های آزمایشگاهی استاندارد به‌طور آزادانه دسترسی داشته باشند. پروتکل آزمایش برای این تحقیق از سوی کمی‌ته تحقیقاتی طرح‌های دانشگاه مورد تصویب قرار گرفت. پس از یک هفته سازگاری حیوانات با محیط جدید، موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی A، B، C و D تقسیم شدند. حیوانات گروه A به عنوان گروه کنترل مدنظر قرار گرفتند و دوز مشخصی از آب مقطر دریافت کردند. حیوانات در گروه B، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر تیامین (فریمان نصر- ایران) دریافت کردند. گروه C، ۸/۵ میلی‌گرم در لیتر استات سرب (مرک آلمان) دریافت کردند. در گروه D حیوانات به‌طور همزمان استات سرب (۸/۵ میلی‌گرم) و تیامین (۳۰ میلی‌گرم در لیتر) را از طریق گاواژ خوراکی دریافت کردند. طرح آزمایش برای ۲۰ روز پی در پی در تمام گروه‌ها دنبال شد. پس از گذشت ۲۰ روز از شروع آزمایش موش‌ها با داروی بی‌هوشی اتر، بی‌هوش و با روش انسانی آسان‌کشی شدند. لایه اسکروتوم بیضه باز شد و بیضه در معرض دید قرار گرفت. کل بیضه از بافت‌های اطراف تشریح شد و خارج گردید. نمونه‌ها پس از شست‌وشو به قطعات کوچک تقسیم شده و در فرمالین مرک بافر ۱۰ درصد به منظور

دستگاه تناسلی نر است که مکانیسم اولیه عمل‌کرد سمی سرب ظاهراً از طریق گسستگی در کنترل هیپوتالاموسی ترشحات هورمون‌های هیپوفیز و در نتیجه اسپرماتوژنز باشد (۱۲). به‌دلیل این که نرها ارگان‌های ضمیمه فرعی ندارند، بنابراین پتانسیل تناسلی نر مربوط به سه فاکتور دسترس پذیری، کمیت و کیفیت اسپرم است (۱۳).

تیامین حاوی مولکول درون‌زاد SH جزء یکی از عوامل حفاظتی در برابر سمیت سرب شناخته شده است (۷). پژوهش‌ها، فراوانی کارآمدی تجویز هم‌زمان ویتامین B1 و ویتامین C برای محافظت یا درمان مسمومیت تجربی با سرب را بیشتر از تأثیر تجویز منفرد هر یک از آن‌ها تأیید کرده‌اند (۴ و ۵). اگرچه پژوهش‌ها، در مورد نقش حفاظتی ویتامین B1 در برابر مسمومیت با سرب اثبات شده و پیش‌تر از آن نیز مدنظر قرار گرفته است، اما گزارش‌ها درباره تجویز هم‌زمان ویتامین B1 و در معرض قرار گرفتن با سرب در زمان‌های مختلف، موضوع جدید و تازه‌ای است. با این‌حال، برخی نویسندگان جنبه‌های متفاوت در معرض قرار گرفتن با غلظت‌های مختلف سرب و اثرات جانبی مربوط به جذب دوز بالای آن را مورد بررسی قرار داده‌اند (۱۴). چنین به نظر می‌رسد که این ویتامین‌ها به شکل پرواکسیدان عمل می‌کنند و در حضور اکسیژن و همراه با تولید آب اکسیژنه می‌توانند سلول‌های آپوپتوزی را معرفی کنند (۱۴). تولید گونه‌های آزاد اکسیژن (ROS) در سلول‌های اسپرماتوزوئید اندام تناسلی موش نر به دنبال سمیت تجربی سرب، مشخص گردیده است بدین صورت که با تجویز هم‌زمان برخی ویتامین‌ها از تخریب سلول‌ها و تولید ROS جلوگیری شده است (۸). این یافته نقش بالقوه ویتامین‌ها را به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در بهبود مسمومیت با سرب نشان می‌دهد. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توانند در پیش‌گیری و یا کاهش اثرات مضر ROS در بیضه و کیفیت اسپرم موثر باشند (۱۶).

تاکنون گزارش جامعی در زمینه‌ی تغییرات





لوله‌های اسپرم‌ساز برهم ریخته بود و اغلب سلول‌ها داخل بافت پوششی زایا تخریب شده بود.

در گروه درمان شده با تیمین (D)، مقاطع بافتی بیضه نشان داد که لوله‌های اسپرم‌ساز تاحدی نامنظم بود و غشای پایه نیز آشفستگی گروه سرب را نشان نداد و سلول‌های بافت پوششی زایای لوله‌ها تقریباً نظم خود را به دست آورده و آن را حفظ کرده بودند.

نتایج مورفومتریک حاصل از بررسی پارامترهای مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. با مقایسه میانگین قطر لوله‌های اسپرم‌ساز در جدول ۱ مشخص گردید که بین گروه‌های A و B هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نگردید؛ اما اختلاف آماری معنی‌دار در دو گروه C و D نسبت به گروه کنترل A وجود داشت ( $P < 0.05$ ). بالاترین مقدار قطر لوله‌ها در گروه A با مقدار  $278/10 \pm 9/5$  میکرومتر و پایین‌ترین مقدار در گروه C با مقدار  $227/57 \pm 8/91$  مشاهده گردید. مقایسه میانگین ضخامت لایه‌ی زایای لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های کنترل و درمان در جدول ۱ نشان می‌دهد که ضخامت این لایه در گروه‌های C و D نسبت به گروه کنترل معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

### بحث

این مطالعه به منظور بررسی اثر حمایتی تیمین در برابر تغییرات ناشی از سرب در بیضه‌ها طراحی شده است. در مطالعه حاضر مشخص شد که سرب سبب کاهش معنی‌دار مقادیر پارامترهای اندازه‌گیری شده نسبت به گروه کنترل، گردید. از سوی دیگر، الگوی مشابهی در تأثیر تیمین همراه با سرب بر قطر و بافت پوششی زایای لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده گردید. چنانکه مقدار کمی هر دو پارامتر مذکور در گروه تیمین همراه با سرب نسبت به گروه سرب به تنهایی افزایش معنی‌داری را نشان داد. این یافته‌ها بهبود ساختار مورفولوژیک بیضه را در گروه تیمین همراه با سرب نشان می‌دهد. اگرچه ابهاماتی در زمینه‌ی

ثبوت به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. آبیگری، پارافین‌دهی و شفاف‌سازی نمونه‌ها با دستگاه اتوتکنیکون صورت گرفت، نمونه‌ها در داخل پارافین مذاب قالب‌گیری شدند و با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. برش‌های بافتی روی لام گرفتند و با استفاده از همتاکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و به وسیله لامل روی لام فیکس شدند. سپس با استفاده از فتومیکروسکوپ نوری (Nikon) به بررسی بافت بیضه و تغییرات صورت پذیرفته در گروه‌های درمان و کنترل پرداخته شد.

اطلاعات به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای مقایسه گروه‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS انجام گرفت و آنالیز با استفاده از تست LSD ادامه یافت. از لحاظ آماری P کوچک‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### نتایج

در گروه‌های کنترل و تیمین (A و B)، آرایش و الگوی منظم و فشرده‌ای از لوله‌های اسپرم‌ساز همراه با بافت بینابینی وجود داشت. در مقاطع بافتی شمار زیادی از لوله‌های اسپرم‌ساز با غشای پایه طبیعی مشاهده گردید. سلول‌های جنسی به شکل منظمی مرتب شده و تمام رده‌های سلولی از اسپرماتوگونی تا اسپرماتوزو که به سلول‌های سرتولی متصل شده بودند وجود داشت. داخل لومن برخی از لوله‌های اسپرم‌ساز در دید میکروسکوپ نوری مقداری از اسپرماتوزو قابل مشاهده بود و فضای بینابینی بین لوله‌ها شامل بافت همبند و سلول‌های بینابینی بود.

در گروه تجویز شده با سرب (C)، چروک شدگی جزئی در لوله‌های اسپرم‌ساز به چشم می‌خورد که همراه با تخریب لوله‌ها بود. بافت بینابینی گسترش قابل توجهی نشان می‌داد و در غشای پایه اغلب لوله‌ها گسیختگی و گسستگی مشاهده گردید. نظم بافت پوششی زایای





مکانسیم عمل وجود دارد، لیکن چنین به نظر می‌رسد که تیامین حذف سرب را از مایعات بدن و دیگر بافت‌ها با استفاده از تشکیل ترکیبات قابل دفع، تسهیل می‌کند (۲) و ۵ و ۶). مطالعه Kim و Blakley در سال ۱۹۹۰ نشان می‌دهد که تیامین از رسوب سرب در بافت‌های کلیه و کبد جلوگیری می‌کند (۱۰). در مطالعه دیگری که WANG و همکاران (۲۰۰۷) به انجام رساندند، اثر محافظتی تیامین بر مسمومیت ناشی از سرب بر برخی اندام‌ها مورد تحقیق قرار گرفت. آن‌ها نشان دادند که علاوه بر القای استرس اکسیداتیو و تغییرات فاکتورهای خونی ناشی از مسمومیت با سرب، زیان‌های DNA نیز مشاهده گردید، سپس عنوان کردند که این تغییرات در گروه تیامین همراه با سرب نسبت به گروه سرب به تنهایی تا حد زیادی بهبود یافته‌اند (۱۴).

اثر سمی سرب بر دستگاه تناسلی نر که موجب اختلال در عمل‌کرد متابولیک اسپرم‌سازی می‌گردد، می‌تواند به وسیله مکمل تیامین تعدیل شود. همچنان‌که شواهد نشان دادند، افزودن تیامین به سرب تا حدی سبب بهبود روند اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم‌ساز گردید. در مطالعه حاضر، مورفولوژی بافت پوششی تناسلی لوله‌های اسپرم‌ساز در هر کدام از گروه‌ها بیان‌گر این نکته بود که اثرات تخریبی سرب بر روند اسپرماتوژنز آشکارا مشهود

بود. از سویی، در گروه تیامین همراه با سرب برخی از این اختلالات ناشی از سرب تا حدی بهبود یافته بود. همچنان‌که به هم ریختگی لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه تیامین با سرب نسبت به گروه سرب به تنهایی کمتر به چشم می‌خورد و بافت پوششی زایای لوله‌ها نیز نظم خود را به دست آورده بودند. در مطالعه‌ای که از سوی Ronis و همکاران در سال ۱۹۹۸ بر مسمومیت ناشی از سرب در سیستم تناسلی موش‌ها صورت پذیرفت، مشخص گردید که سرب موجب کاهش تولید هورمون‌های استروئیدی جنسی شده و به این شکل می‌توانند بلوغ را به تأخیر بیندازند (۱۱). برخی مطالعات تحریک‌پذیری اسپرم را در مواجهه با سرب مورد بررسی قرار داده و نشان داده‌اند که سرب می‌تواند اثرات زیان‌باری بر مورفولوژی و تحریک‌پذیری اسپرم داشته باشد (۴ و ۱۲). دیگر مطالعات در مواجهه با مسمومیت با سرب نشان داده‌اند که مورفومتربیک اسپرماتوژنز تحت تأثیر سرب قرار گرفته و مشخص گردیده که با القای سرب، کاهش معنی‌داری در ضخامت بافت پوششی زایای لوله‌های اسپرم ساز ایجاد شده است (۱).

در پایان مطالعه حاضر نشان داد که تیامین یک نقش محافظتی در برابر سمیت سرب ایفا می‌کند و می‌طلبد که نقش این ویتامین در انسان نیز مورد ارزیابی فراگیر قرار گیرد.

جدول ۱- مقایسه میانگین و انحراف معیار قطر و ضخامت لایه زایا در لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه‌های کنترل و درمان

گروه‌ها				پارامترها
گروه D	گروه C	گروه B	گروه A	
۲۴۸/۴۲±۶/۳۲ <sup>*,**</sup>	۲۲۷/۵۷±۸/۹۱ <sup>*,**</sup>	۲۷۴/۷۳±۷/۱	۲۷۸/۱۰±۹/۵	قطر لوله‌ها
۲۵۰/۴۸-۲۶۲/۲۱	۲۲۸/۵۱-۲۴۲/۴۶	۲۶۸/۵۱-۲۷۷/۴۶	۲۷۲/۹-۲۸۱/۶۸	CI %۹۵
۵۵/۳۱±۲/۸ <sup>*,**</sup>	۴۲/۸±۱/۹۷ <sup>*,**</sup>	۶۶/۷۲±۲/۲	۶۷/۱۴±۳/۶	ضخامت لایه زایا
۵۴/۳۸-۵۶/۹۶	۳۹/۵۴-۴۷/۲۴	۶۵/۶۲-۶۷/۹۴	۶۶/۸-۶۸/۳۴	CI %۹۵
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	تعداد

\* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل؛ \*\* اختلاف معنی‌دار با یکدیگر (P<۰/۰۵)

Portan rats exposed to various levels of lead with regard to zinc status. Br J Nutr; 2004; 91(03): 387-91.

منابع

- 1- Batra, N.; Nehru, B. and Bansal, M.; Reproductive potential of male



- Biochem. Physiol. Part C, Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.; 1991; 100(3): 417-21.
- 8- Hsu, P.C; Liu, M.Y; Hsu, C.C; Chen, L.Y. and Leon Guo, Y.; Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. Toxicology; 1998; 128(3): 169-79.
- 9- Johansson, L. and Pellicciari, C.E.; Lead-induced changes in the stabilization of the mouse sperm chromatin. Toxicology; 1988; 51(1): 11-24.
- 10- Kim, J.S; Blakley, B.R. and Rousseaux, C.G; The effects of thiamin on the tissue distribution of lead. J Appl Toxicol; 1990; 10(2): 93-97.
- 11- Ronis, M.J; Badger, T.M; Shema, S.J; Roberson, P.K. and Shaikh, F.; Reproductive toxicity and growth effects in rats exposed to lead at different periods during development. Toxicol Appl Pharmacol; 1996; 136(2): 361-71.
- 12- Sokol, R.Z; Hormonal effects of lead acetate in the male rat: mechanism of action. Biol Reprod; 1987; 37(5): 1135-8.
- 13- Tsuji, L. and Karagatzides, J; Chronic lead exposure, body condition, and testis mass in wild
- 2- Bratton, G.R.; Żmudzki, J.; Bell, M.C. and Warnock, L.G.; Thiamin (vitamin B1) effects on lead intoxication and deposition of lead in tissues: Therapeutic potential. Toxicol Appl Pharmacol; 1981; 59(1): 164-72.
- 3- Bustos-Obregón, E; Adverse effects of exposure to agropesticides on male reproduction. APMIS; 2001; 109(103): 233-S42.
- 4- Dhawan, M; Kachru, D.N. and Tandon, S.K; Influence of thiamine and ascorbic acid supplementation on the antidotal efficacy of thiol chelators in experimental lead intoxication. Arch Toxicol; 1988; 62(4): 301-4.
- 5- Flora, S. and Tandon, S; Preventive and therapeutic effects of thiamine, ascorbic acid and their combination in lead intoxication. Acta Pharmacol Toxicol; 1986; 58(5): 374-8.
- 6- Foster, W.G.; McMahon, A. and Rice, D.C.; Sperm chromatin structure is altered in cynomolgus monkeys with environmentally relevant blood lead levels. Toxicol Ind Health; 1996; 12(5): 723-35.
- 7- Ghazaly, K; Influences of thiamin on lead intoxication, lead deposition in tissues and lead hematological responses of Tilapia zillii. Comp.





- mallard ducks. Bull Environ Contam Toxicol; 2001; 67(4): 489-95.
- 14- Wang, C; Liang, J; Zhang, C; Bi, Y; Shi, X. and Shi, Q; Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. Ann Occup Hyg; 2007; 51(6): 563-9.
  - 15- Winder, C; Reproductive and chromosomal effects of occupational exposure to lead in the male. Reprod Toxicol; 1989; 3(4): 221-33.
  - 16- Yousef, M.I.; and Vitamin E; modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits. Food Chem Toxicol; 2010; 48(5): 1152-1159.





# Therapeutic effect of the thiamine on the histomorphometric structure of testis following lead poisoning in mouse model

Fatahian Dehkordi, R.<sup>1\*</sup>; Khoravian Dehkordi, S.<sup>2</sup>; Aali, A.<sup>3</sup>

1. Assistance Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord-Iran.
2. Postgraduate of Biochemidtry, Faculty of Basic Sciences, University of Falavarjan, Falavarjan-Iran.
3. DVM Graduated Steudent, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord- Iran.

*Recieved:* 8 March 2015

*Accepted:* 2 May 2016

## Summary

Several studies have been reported the effects of thiamine on the testis tissue caused by lead poisoning, but the effect on morphometric structure of testis in mice that have received the Lead has not been studied. The aim of this study was to evaluate the effect of thiamine on the morphological structure of the seminiferous tubules were contaminated with lead. This experimental study was performed on 40 Wistar rats. The mice were randomly divided into 4 groups of 10 specimens, including groups A (control), B (thiamine recipient), C (a stump flock Pb) and D (treated with thiamine and Pb), respectively. Lead to a value of 8.5 mg per liter and thiamine supplementation at a rate of 30 mg per liter was administered orally every day. Routine histological tissue specimens prepared and using one-way ANOVA was used to analyze the data. The lead induction causes morphological disorganization in the seminiferous tubules including the cell lines when compared to groups A and B and thiamine supplementation partially reduced these changes. Seminiferous tubules diameter and thickness of the epithelium layer genital germ tubules in the lead group decreased significantly when compared to the control group ( $P < 0.05$ ), while the recovery of these parameters in group D than in group A have been observed. Lead exposure has detrimental effects on spermatogenesis, but the administration of thiamine can improve the quantity and quality of the testis morphological parameters.

**Keywords:** Rat, Lead, Thiamine, Histopathology.

\* Corresponding Author E-mail: [fatahian\\_1349@yahoo.com](mailto:fatahian_1349@yahoo.com)

