

اثر عصاره هیدروالکی دانه گیاه سیاهدانه بر پارامترهای اسپرمی و اسپرماتوژنز در سمیت القاء شده با دیازینون در موش صحرائی نر

ریحانه قاسمی^۱، فرشته میرمحمد رضایی^{۲*}، سیما نصری^۱، امیر نیلی احمدآبادی^۲

^۱گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ^۲گروه زیست شناسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، ^۳گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: دیازینون حشره کشی ارگانوفسفره است که در کشاورزی استفاده می‌شود و با تولید رادیکال‌های آزاد می‌تواند بر باروری مردان تأثیر بگذارد. به علت خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های سیاهدانه در مطالعه حاضر اثر عصاره هیدروالکی سیاهدانه بر اسپرماتوژنز در سمیت القاء شده با دیازینون در موش صحرائی نر مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از ۳۰ موش نر بالغ نژاد ویستار استفاده شد که به شش گروه شامل: کنترل منفی بدون مداخله گروه شم، روغن ذرت و سالیین دریافت کرد، گروه کنترل مثبت، سم دیازینون را با غلظت ۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرد، تجربی ۱ و ۲ به ترتیب سم دیازینون را با غلظت ۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرد، تجربی ۳ عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم دریافت کرد، تقسیم شدند. تمام تیمارها به مدت ۲ ماه و به صورت گاوژ انجام گرفت. پس از ۲ ماه پارامترهای اسپرمی شامل تعداد، تحرک، حیات و مورفولوژی بررسی گردید. هم‌چنین بافت بیضه جهت ارزیابی اسپرماتوژنز پس از برش‌گیری، به وسیله هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم سبب کاهش معنی‌داری در تعداد و تحرک اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شم گردید ($p < 0/01$) ($p < 0/01$)، اما تغییر معنی‌داری بر حیات و مورفولوژی اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شم نداشت. گروهی که سم دیازینون و عصاره سیاهدانه با دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کردند در مقایسه با گروه دیازینون افزایش قابل توجهی در تعداد اسپرم‌ها نشان دادند ($p < 0/01$) ($p < 0/01$)، اما سیاهدانه سبب تغییر معنی‌داری بر روی تحرک اسپرم در حضور سم دیازینون نگردید. بررسی بافت شناسی نشان داد تعداد سلول اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در گروه دریافت کننده سم دیازینون در مقایسه با گروه شم کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). در صورتی که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه دیازینون نشان داد ($p < 0/05$). در گروه تجربی ۳، عصاره سبب افزایش تعداد اسپرم در مقایسه با گروه شم گردید ($p < 0/05$)، اما تغییر معنی‌داری در بافت بیضه ایجاد نکرد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد عصاره سیاهدانه اثر حفاظتی بر بافت بیضه داشته و می‌تواند موجب افزایش اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید و تعداد اسپرم در سمیت القاء شده با دیازینون گردد، اما تأثیری بر تحرک اسپرم ندارد.

واژه‌های کلیدی: سم دیازینون، سیاهدانه، پارامترهای اسپرم، بیضه

* نویسنده مسئول: فرشته میرمحمد رضایی، بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

Email: fereshteh.mmrezaei@gmail.com

مقدمه

بر طبق گزارش‌های کمیته بین‌المللی نظارت بر روش‌های کمک باروری و سازمان بهداشت جهانی، ناباروری یک بیماری دستگاه تناسلی، با عدم موفقیت برای رسیدن به حاملگی در مدت یک‌سال می‌باشد (۱). حدود ۵۰ درصد از موارد ناباروری مربوط به مردان است (۲)، عوامل مختلفی از قبیل؛ اختلالات ژنتیکی، انسداد مجرای تناسلی، واریکوسل، کاهش تولید اسپرم و کاهش پارامترهای مایع منی در بروز ناباروری مردان نقش دارند. بررسیها نشان داده که پارامترهای مایع منی در ۲۵-۴۰ درصد از مردان جوان، زیر استاندارد سازمان بهداشت جهانی است (۳). اکثر علل ناباروری در مردان ناشی از کاهش تولید اسپرم مرتبط با عوامل محیطی و تغذیه‌ای است (۴). کشاورزی مدرن به طور فزاینده‌ای به استفاده از آفت‌کش‌ها متکی است (۵). دیازینون از جمله حشره کش‌های ارگانوفسفره است که به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶) که می‌تواند باعث مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز شود. علاوه بر این با ایجاد استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن و اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن شود. استرس اکسیداتیو در نتیجه ی عدم تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌ها و تولیدات ROS در بدن به وجود می‌آید و می‌تواند باعث آسیب به DNA اسپرم، مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و در نتیجه ناباروری مردان شود. آنتی‌اکسیدان‌ها، ROS را

خنثی می‌کنند و نقش مهمی در حفظ تعادل اکسیدان بر آنتی‌اکسیدان در بدن دارند (۷). در شرایط استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان‌های درونی برای مقابله با افزایش سطوح ROS کافی نیستند (۸). مصرف به اندازه و مناسب آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و ویتامین‌ها می‌توانند از DNA اسپرم در برابر آسیب‌های استرس اکسیداتیو محافظت کنند و در نتیجه باعث بهبود باروری مردان شوند (۹). در حال حاضر گیاهان دارویی به طور سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند و منبع داروهای زیادی هستند و بسیاری از داروهای مهم به طور مستقیم یا غیر مستقیم از گیاهان یا از مولکول‌ها با منشأ گیاهی، مشتق شده‌اند (۱۰). درمان‌های جایگزین مانند گیاهان دارویی در مقایسه با سایر روش‌های درمانی هم کم هزینه‌تر و هم آسیب‌های جسمی کمتری دارد. بر اساس مطالعه‌های گوناگون مصرف برخی از گیاهان می‌توانند اثرات مثبتی بر پارامترهای اسپرمی بگذارند (۳). سیاهدانه *Nigella sativa* گیاهی از خانواده آلانگان است که به عنوان دارو برای تعدادی از بیماری‌ها مانند آسم، فشار خون بالا، دیابت، التهاب، سرفه و همچنین به عنوان چاشنی و ادویه در مواد غذایی، به کار گرفته می‌شود (۱۱) و به طور گسترده‌ای در بسیاری از کشورهای خاورمیانه رشد می‌کند. دانه‌های آن سیاه و تلخ مزه است (۹) و شامل اجزای تغذیه‌ای مانند؛ کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها، ویتامین‌ها، عناصر معدنی و پروتئین‌ها از جمله ۸ اسید آمینه

ضروری است. سیاهدانه دارای اسیدهای چرب غیر اشباع (لینولئیک اسید و اولئیک اسید) و اسیدهای چرب ضروری بسیاری است (۳). در سال‌های اخیر تحقیق‌های دارویی نشان داده است که بیشتر خواص درمانی این گیاه به علت تیموکینون می‌باشد که جزء فعال اصلی روغن سیاهدانه به حساب می‌آید. داده‌های قبلی نشان می‌دهد که روغن دانه‌ها و تیموکینون اثر حفاظتی بر اسپرم و در برابر آسیب بیضه‌ای دارد. روغن سیاهدانه احتمالاً از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی ترکیب‌های فعال زیستی خود، دارای توانایی حفاظت از بیضه در برابر استرس اکسیداتیو است (۹). همچنین برخی از ترکیب‌های مشتق شده از گیاهان که به وفور در رژیم غذایی استفاده می‌شوند از جمله؛ زنجبیل، ریحان، دارچین منابع غنی از ویتامین‌ها، فلاونوئیدها و مواد معدنی می‌باشند که تأثیرات قابل توجهی در باروری دارند به طوری که زنجبیل می‌تواند کیفیت و تحرک اسپرم و وزن اندام‌های تولید مثلی را افزایش دهد (۱۲). همچنین مطالعه اثر حفاظتی عصاره متانولی زرشک در آسیب‌های بیضه ناشی از تتراکلرید کربن در موش‌های صحرایی را نشان داده که سبب کاهش قابل توجهی در ضخامت بافت بینابینی و افزایش قابل توجهی در وزن بیضه، شاخص اسپرمیوژنز و شاخص تمایز سلولی، قطر لوله‌های منی‌ساز و سطح تستوسترون می‌شود (۱۳). از آنجایی که گیاهان ذکر شده در رژیم غذایی افراد به راحتی می‌توانند وارد شوند و اثرات مثبتی بر باروری مردان دارند در این

مطالعه بر آن شدیم که با توجه به استفاده گسترده از سموم ارگانوفسفره (به خصوص دیازینون) در کشاورزی و باغداری و اهمیت اثرات این ترکیب‌ها در بروز صدمات اکسیداتیو و وقوع ناباروری با بهینه‌سازی رژیم غذایی و استفاده از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان موجود در ترکیب‌های گیاهی که در دسترس بوده و به راحتی می‌تواند در رژیم غذایی وارد شود از بروز ناباروری در افرادی که بیشتر در معرض این سموم هستند تا حدودی جلوگیری کرد، لذا با توجه به ویژگی آنتی‌اکسیدانی شناخته شده سیاهدانه و با توجه به این که این گیاه به عنوان منبع مهم تغذیه، در انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد و از آنجایی که هیچ مطالعه‌ای مبنی بر اثر سیاهدانه بر کیفیت پارامترهای اسپرمی و اسپرماتوژنز در حیوانات مسموم با دیازینون انجام نگرفته است سبب گردید تا در این پژوهش تجربی، اثر حفاظتی عصاره هیدروالکلی دانه سیاهدانه بر پارامترهای اسپرمی و اسپرماتوژنز در سمیت القاء شده با دیازینون در موش صحرایی نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، برای تهیه عصاره هیدروالکلی، ابتدا دانه سیاهدانه که در استان اصفهان کشت شده بود به وسیله گیاه شناس با کد هرباریومی HUMZ ۷۸۰۱ شناسایی گردید، سپس جهت عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. عصاره‌گیری

سم دیازینون و عصاره سیاهدانه به شیوه گاوژ به حیوانات داده شد به طوری که ابتدا سم دیازینون و پس از ۲ ساعت عصاره سیاهدانه گاوژ گردید. پس از ۲ ماه، حیوانات از طریق تزریق کتامین - زایلازین بیهوش شدند. بعد از تشریح موش‌ها، بیضه‌ها جهت فیکس شدن برای مطالعه‌های بافت‌شناسی و بررسی اسپرماتوژنز در ظرف فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند و پس از تهیه برش‌های بافتی با رنگ هماتوکسلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. اپیدیدیم جهت بررسی کیفیت سمن (تحرك اسپرم، تعداد کل اسپرم، حیات اسپرم و مورفولوژی اسپرم) مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی حیات و مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ ائورین و نیگروزین انجام گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار prism و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در گروهی که به مدت ۲ ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرد تعداد اسپرم به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شم کاهش یافت ($P < 0/01$). در صورتی که عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حضور سم دیازینون باعث افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم در مقایسه با گروه دیازینون

به روش خیساندن در حلال متانول ۸۰ درصد ۳ دوره و هر دوره به مدت ۷۲ ساعت انجام گردید. سپس، به کمک حلال نرمال سالین، غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره سیاه دانه تهیه شد.

در این تحقیق ۳۰ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با محدوده ی وزنی 200 ± 5 از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل خریداری و در شرایط دمایی ۲۳-۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی به شش گروه شامل؛ گروه کنترل منفی گروهی که سم و عصاره دریافت نکرد، گروه شم گروهی که به مدت ۲ ماه با روغن ذرت و نرمال سالین گاوژ شد، گروه کنترل مثبت گروهی که ۲ ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم از طریق گاوژ دریافت کرد، گروه تجربی ۱ گروهی که به مدت ۲ ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به شیوه گاوژ دریافت کرد و گروه تجربی ۲ گروهی که ۲ ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عصاره ی سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به روش گاوژ دریافت کرد، گروه تجربی ۳ عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به شیوه گاوژ دریافت کرد (جهت بررسی اثرات سمی احتمالی عصاره سیاهدانه با بالاترین غلظت گاوژ شد) تقسیم شدند.

گردید ($p < 0/01$) ($p < 0/001$) (جدول ۱). همچنین در گروه دریافت کننده عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد اسپرم افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شمش نشان داد ($p < 0/05$). تحرک اسپرم در گروه دریافت کننده سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شمش کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/001$).

همچنین گروه دریافت کننده عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییر معنی‌داری در تحرک اسپرم در مقایسه با گروه شمش نشان نداد. در گروه‌هایی که سم دیازینون و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده بودند، تغییری در تحرک اسپرم نسبت به گروه دیازینون مشاهده نشد. از طرف دیگر بین اثر عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حضور دیازینون تغییر معنی‌داری در تعداد اسپرم و تحرک اسپرم مشاهده نشد (جدول ۱).

تصاویر میکروسکوپی از رنگ‌آمیزی ائوزین - نیگروزین نشان داد که سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عصاره سیاهدانه در هر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حضور دیازینون تغییر معنی‌داری در حیات اسپرم‌ها و مورفولوژی اسپرم ایجاد نکرد. همچنین عصاره سیاهدانه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز تغییر معنی‌داری در حیات و مورفولوژی اسپرم در مقایسه با گروه شمش نشان نداد.

همچنین مطالعه‌های بافتی نشان داد که در گروه دریافت کننده سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد سلول اسپرماتوگونی نسبت به گروه شمش کاهش معنی‌داری نداشت. در حالی که گروه دریافت کننده سم دیازینون و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه دیازینون افزایش معنی‌داری در تعداد سلول اسپرماتوگونی نشان داد ($p < 0/05$). همچنین در گروه دریافت کننده عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شمش تغییری در تعداد سلول اسپرماتوگونی مشاهده نشد. (جدول ۲) (شکل ۱). همچنین تعداد سلول اسپرماتوسیت اولیه در گروه دریافت کننده سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شمش کاهش قابل توجهی نشان داد ($p < 0/05$). در صورتی که سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه در گروه‌های دریافت کننده سم دیازینون و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه دیازینون افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($p < 0/05$) (جدول ۲) (شکل ۱). همچنین در گروهی که به مدت ۲ ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کرده بودند تعداد اسپرماتید نسبت به گروه شمش کاهش معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$). گروه‌های دریافت کننده سم دیازینون و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروهی که سم دیازینون دریافت کرده بود افزایش قابل توجهی در

تعداد اسپرماتید نشان دادند ($p < 0.05$). همچنین در مطالعه بافتی بین اثر عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حضور دیازینون تغییر معنی‌داری در تعداد اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید مشاهده نشد (جدول ۱).

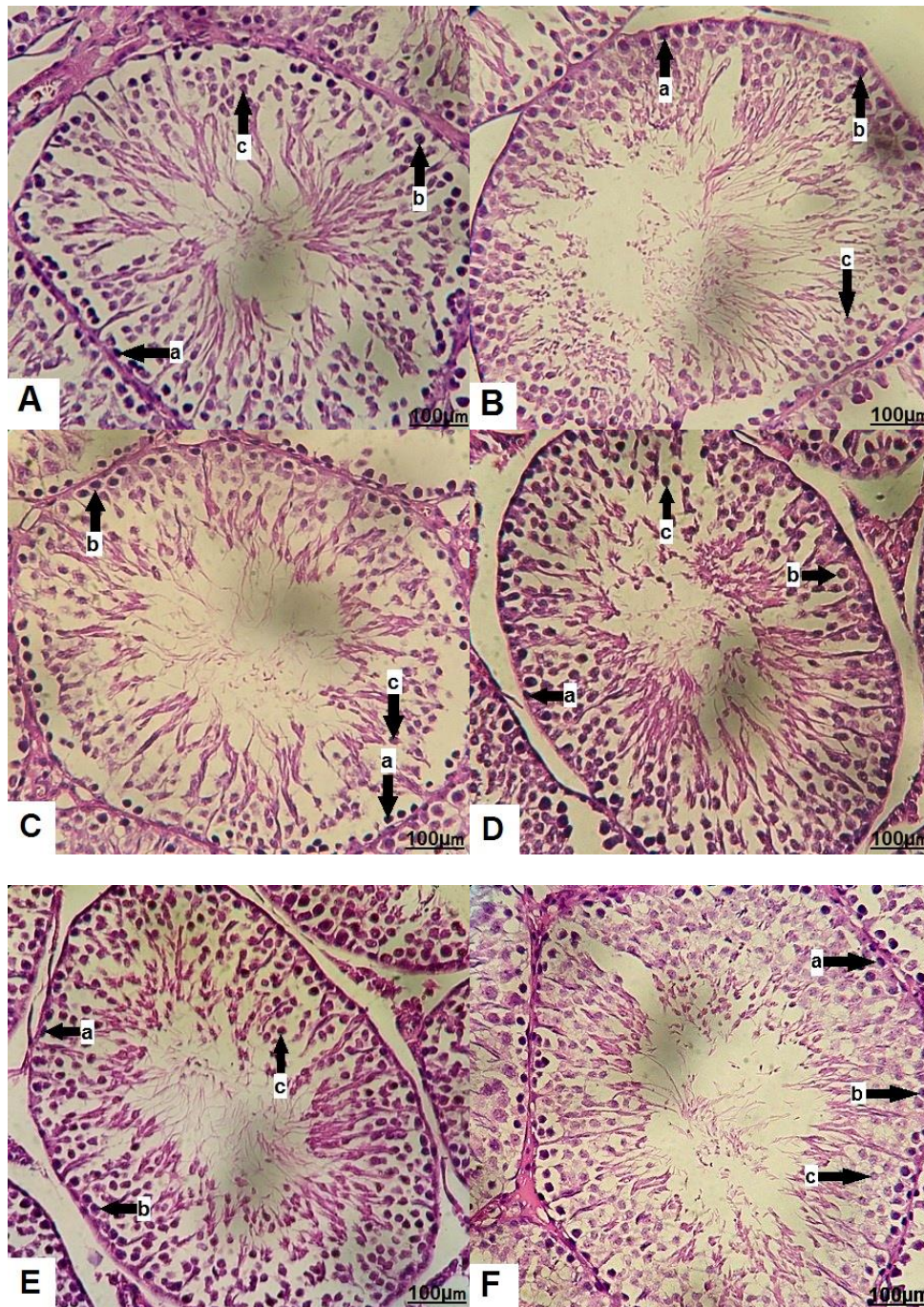
در گروه دریافت کننده عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شم تعداد سلول اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در مقایسه با گروه شم افزایش معنی‌داری نشان نداد. (جدول ۲) (شکل ۱).

جدول ۱: اثر عصاره سیاهدانه با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر تعداد و تحرک اسپرم در سمیت القاء شده با دیازینون نتایج به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است. اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم $(P < 0.001)$ ، $xx (P < 0.01)$ ، $xxx (P < 0.001)$ ، اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه دیازینون $(P < 0.001)$ ، $++ (P < 0.01)$

گروهها	تعداد اسپرم ($\times 10^6$)	تحرک اسپرم
کنترل	$105/25 \pm 21/07$	$45/68 \pm 0/96$
شم (روغن زرت + سالیسین)	$147/12 \pm 29/45$	$39/85 \pm 5/49$
دیازینون (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$46/66 \pm 8/71^{**}$	$5/1 \pm 1/25^{***}$
دیازینون + عصاره سیاهدانه (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$140/68 \pm 33/23^{++}$	$5/06 \pm 1/10$
دیازینون + عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$173/25 \pm 42/92^{+++}$	$2/63 \pm 0/74$
عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$161/2 \pm 17/65^*$	$36/06 \pm 4/67$

جدول ۲: اثر عصاره سیاهدانه با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر تعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید در سمیت القاء شده با دیازینون نتایج به صورت $Mean \pm SD$ بیان شده است. اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم ($p < 0.05$)، اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه دیازینون ($p < 0.05$)

گروهها	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتوسیت اولیه	تعداد اسپرماتید
کنترل	$37/71 \pm 7/66$	$53/25 \pm 12/36$	$152/08 \pm 34/93$
شم (روغن زرت + سالیسین)	$42/23 \pm 8/67$	$63/18 \pm 10/67$	$171/68 \pm 29/21$
دیازینون (۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$36/75 \pm 5/24$	$42/20 \pm 7/71^*$	$140/88 \pm 25/33^x$
دیازینون + عصاره سیاهدانه (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$48/5 \pm 8/45^+$	$67/5 \pm 12/69^+$	$176 \pm 30/13^+$
دیازینون + عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$46/5 \pm 10/55^+$	$70/35 \pm 10/88^+$	$166/42 \pm 26/51^+$
عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	$42/23 \pm 5/67$	$68/9 \pm 12/84$	$169/96 \pm 35/19$



شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی بافت بیضه در حضور دیازینون و عصاره سیاهدانه با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (۴۰×).
 گروه کنترل، B گروه شم، C گروه دیازینون (۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم)، D گروه دیازینون + عصاره سیاهدانه (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، E
 گروه دیازینون + عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، F گروه عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) (a: اسپرماتوگونی،
 b: اسپرماتوسیت اولیه، c: اسپرماتید)

بحث

صحرائی در سمیت القاء شده با دیازینون مورد
 بررسی قرار گرفت. بررسی منی نشان داد که سم
 دیازینون با غلظت ۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم به مدت ۲

در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکی دانه
 سیاهدانه بر شاخص های باروری موش های

برابر استرس اکسیداتیو تولید شده به وسیله پارانونایل فنل که یک آلاینده زیست محیطی است، داشته است (۱۹). همچنین سیاهدانه به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی می‌تواند باعث حفاظت اسپرم‌ها و بیضه از آسیب‌های رادیکال‌های آزاد شود (۲۰). بررسی بافتی این مطالعه نشان داد که دریافت سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲ ماه تغییری در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ایجاد نکرد، اما کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در مقایسه با گروه شام ایجاد کرد. همچنین سم دیازینون سبب تغییر معنی‌داری در تعداد سلول‌های لایدیگ و سرتولی نگردید. نتایج بافتی فتاحی و همکاران نشان داد که تزریق درون صفاقی دیازینون با غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتید شد. اثرات سم دیازینون ممکن است به دلیل تحریک پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد (۱۴). همچنین جورسرای و همکاران نشان دادند که تجویز دوزهای ۲۵ میلی‌گرم و ۲/۵ میلی‌گرم سم دیازینون به مدت ۳۵ روز باعث کاهش تعداد سلول‌های زایا و سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و ثانویه نسبت به گروه کنترل شده است، همچنین تعداد این سلول‌ها در گروه دریافت‌کننده دیازینون با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور قابل توجهی پایین‌تر از غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوده است (۲۱). تجویز دراز مدت سم دیازینون می‌تواند بر بافت بیضه تأثیر

ماه تعداد و حرکت اسپرم را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد، اما در مورفولوژی و حیات اسپرم تغییر قابل توجهی ایجاد نکرد. اختلال ایجاد شده در اسپرماتوژنز و باروری مردان به وسیله دیازینون می‌تواند به دلیل کاهش سطح سرمی تستوسترون باشد (۱۴). سموم ارگانوفسفره با اثر بر سیستم اندوکرینی می‌توانند سطوح هورمون‌های استروئیدی را کاهش داده و با تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن باعث آسیب‌های تولید مثلی و کاهش تعداد و تحرک اسپرم شوند (۱۶ و ۱۵). در این مطالعه بررسی مایع منی نشان داد که مصرف خوراکی عصاره سیاهدانه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب افزایش قابل توجهی در تعداد اسپرم‌های موش‌هایی شد که به مدت ۲ ماه تحت تأثیر سم دیازینون قرار گرفته بودند. در مطالعه‌ای که پرندین و همکاران انجام دادند مشخص شد که عصاره سیاهدانه در هر دو غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور قابل توجهی باعث افزایش تعداد اسپرم می‌شود (۱۷). همچنین نتایج‌ها و همکاران مشخص کرد که دریافت روغن سیاهدانه به مدت ۴ هفته دارای اثر حفاظتی در برابر آسیب بیضه‌ای ناشی از سدیم والپروات است. که سبب بهبود کیفیت و کمیت مایع منی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در بیضه شده است (۱۸). همچنین مطالعه شریعت‌زاده و کیخا نشان داد که روغن سیاهدانه اثر حفاظتی بر اسپرم‌ها و بیضه در

گذاشته و باعث کاهش بیشتر در سلول‌های زایا شود که می‌توان این تاثیر را به تولید رادیکال‌های آزاد به وسیله این سم نسبت داد (۱۵). در گروه‌هایی که سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عصاره سیاهدانه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید افزایش قابل توجهی در مقایسه با گروه دیازینون داشته است. از طرف دیگر تفاوت قابل توجهی بین اثر عصاره سیاهدانه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در حضور دیازینون در مطالعه‌های بافتی مشاهده نشد. احمد الساعدی و همکاران نشان دادند که استفاده از سیاهدانه منجر به بهبود اسپرماتوزنز و همچنین باعث افزایش اندازه و ضخامت دیواره لوله‌های اسپرم ساز و تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، ثانویه، اسپرماتیدها و اسپرم‌ها در لومن لوله‌های اسپرم ساز شده است (۲۲). تیموکینون که ماده اصلی فعال استخراج شده از روغن سیاهدانه است استرس اکسیداتیو و التهاب بافتی را مهار می‌کند و از طریق توانایی اش در مهار رادیکال‌های آزاد دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قوی است و در بافت‌های مختلف، دارای اثر حفاظتی در برابر پراکسیداسیون لیپیدی است (۲۳ و ۲۴). به نظر می‌رسد در این مطالعه نیز سیاهدانه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی اش از طریق کاهش تولید رادیکال آزاد سبب افزایش تعداد اسپرم، سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید شده و دارای نقشی حفاظتی بر

تعداد اسپرم در برابر آسیب‌های سم دیازینون بر باروری است. مطالعه‌های گوکشی و همکاران بر اثرات حفاظتی تیموکینون بر آسیب‌های بافتی ایجاد شده به وسیله داروی متوترکسات نیز نشان داد که تیموکینون احتمالاً از طریق مهار تولید رادیکال آزاد باعث حفاظت اسپرم از آسیب‌های متوترکسات بر سلول‌های زایا و همچنین باعث افزایش تعداد اسپرم و حفاظت از بیضه می‌شود (۲۵). توانایی تحرک از عملکردهای اصلی اسپرم است که می‌تواند تحت تأثیر آسیب‌های استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی قرار گیرد. در انواع گونه‌های مختلف وجود ارتباط بین تحرک اسپرم و تشکیل پراکسیدلیپیدی دیده شده است (۲۶). تحرک اسپرم از مهم‌ترین پارامترهای اسپرمی است که برای ارزیابی قابلیت لقاح اسپرم مورد بررسی قرار می‌گیرد که اختلال در این پارامتر اسپرمی می‌تواند احتمال ناباروری مردان را افزایش دهد (۱۹). بررسی پارامترهای اسپرمی نشان داد تحرک اسپرم‌ها در حضور دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. به نظر می‌رسد دیازینون از طریق تولید رادیکال‌های آزاد می‌تواند بر تحرک اسپرم‌ها تأثیر بگذارد و باعث کاهش تحرک شود. در مطالعه حاضر بررسی تحرک اسپرم نشان داد که عصاره سیاهدانه اثر مثبتی بر تحرک اسپرم‌هایی که تحت سمیت دیازینون قرار گرفتند، نداشته است. پرندین و همکاران نشان دادند که عصاره سیاهدانه در دوزهای ۲۰۰ و

۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نیز تأثیر قابل توجهی بر تحرک اسپرم نداشته است (۱۷).

نتیجه گیری

عصاره سیاهدانه با دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم نقش حفاظتی در برابر آسیب‌های ناشی از سمیت دیازینون بر تعداد اسپرم و بافت بیضه دارد به طوری که سبب افزایش اسپرماتوژنز و تعداد اسپرم‌ها می‌گردد، اما نتوانست آسیب سم دیازینون بر تحرک اسپرم را بهبود بخشد. بنابراین مطالعه‌های بعدی نیاز به بررسی هم‌زمان ترکیب‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدانی دارد که به همراه عصاره سیاهدانه استفاده شود که علاوه بر حفظ اثر سیاهدانه بر تعداد اسپرم، تحرک اسپرم را که ناشی از سمیت دیازینون می‌باشد را بهبود بخشد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه پیام نور تهران می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه مازندران و دانشگاه پیام نور تهران انجام گرفته است. از همکاری زهرا احسانی فرد و نجمه نائیجی در انجام این پژوهش تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم.

REFERENCES:

1. Gurunath S, Pandian Z, Anderson R A, Bhattacharya S. Defining infertility—a systematic review of prevalence studies. *Hum Reprod Update* 2011; 17(5): 575-88.
2. Wong E W, Cheng C Y. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(5): 290-9.
3. Mohammadi F, Nikzad H, Taherian A, Amini Mahabadi J, Salehi M. Effects of herbal medicine on male infertility. *Anat Sci J* 2013; 10(4): 3-16.
4. El-baset SAA, El-Wahab SMA, Mansour AM, Mohamed EA. Light and electron microscopic study of the effect of L-carnitine on the sperm morphology among sub fertile men. *Middle East Fertil Soc J* 2010; 15(2): 95-105.
5. Sohrabvand F, Jafari M, Shariat M, Haghollahi F, Lotfi M. Frequency and epidemiologic aspects of male infertility. *Acta Med Iran* 2015; 53(4): 231-35.
6. Al-Attar AM. Effect of grapeseed oil on diazinon-induced physiological and histopathological alterations in rats. *Saudi J Biol Sci* 2015; 22(3): 284-92.
7. Sargazi Z, Nikraves MR, Jalali M, Sadeghnia H, Anbarkeh FR, Mohammadzadeh L. Gender-related differences in sensitivity to diazinon in gonads of adult rats and the protective effect of vitamin E. *Int J Women's Health Reprod Sci* 2015; 3(1): 40-7.
8. Amoussa AMO, Sanni A, Lagnika L. Antioxidant activity and total phenolic, flavonoid and flavonol contents of the bark extracts of *Acacia ataxacantha*. *J Pharmacogn Phytochem* 2015; 4(2): 172-8.
9. Haseena S, Aithal M, Das KK, Saheb SH. Effect of thymoquinone on testosterone and lh levels in streptozotocine induced diabetic male albino Rats. *J Pharm Sci & Res* 2015; 7(8): 554-56.
10. Shakeri F, Gholamnezhad Z, Mégarbane B, Rezaee R, Boskabady MH. Gastrointestinal effects of *Nigella sativa* and its main constituent, thymoquinone: a review. *Avicenna J Phytomed* 2016; 6(1): 9-20.
11. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res* 2003; 17(4): 299-305.
12. Alizadeh H, Khaki A, Farzadi L, Nouri M, Ahmadi-Asrbadr Y, Seyed-Ghiasi G, et al. The therapeutic effects of a medicinal plant mixture in capsule form on catalase levels in the semen of men with oligospermia. *Crescent J Med Biol Sci* 2015; 2(1): 9-16.
13. Rafiee F, Nejati V, Heidari R, Ashraf H. Protective effect of methanolic extract of *Berberis integerrima* Bunge. root on carbon tetrachloride-induced testicular injury in Wistar rats. *Int J Reprod BioMed* 2016; 14(2): 133-40.
14. Fattahi E, Parivar K, Jorsaraei SGA, Moghadamnia AA. The effects of diazinon on testosterone, FSH and LH levels and testicular tissue in mice. *Int J Reprod Biomed* 2009; 7(2): 59-64.
15. Fattahi E, Jorsaraei SGA, Parivar K, Moghaddamnia AA. The effects of a single dosage of Diazinon and Hinosan on the structure of testis tissue and sexual hormones in Mice. *Yakhteh Med J* 2010; 12(3): 405-10.
16. Betancourt M, Reséndiz A, Fierro EC. Effect of two insecticides and two herbicides on the porcine sperm motility patterns using computer-assisted semen analysis (CASA) in vitro. *Reprod Toxicol* 2006; 22(3): 508-12.
17. Parandin R, Yousofvand N, Ghorbani R. The enhancing effects of alcoholic extract of *Nigella sativa* seed on fertility potential, plasma gonadotropins and testosterone in male rats. *Iran J Reprod Med* 2012; 10(4): 355-62.
18. Hala MA. Protective effect of *Nigella sativa*, linseed and celery oils against testicular toxicity induced by sodium valproate in male rats. *Journal of American Science* 2011; 7(5): 687-93.
19. Shariatzadeh MA, Keikha L. Evaluation of the protective effect of *nigella sativa* oil on testicular tissue and sperm parameters in adult nmri mice treated with para-nonylphenol. *SSU_Journals* 2015; 23(2): 1927-44.
20. Soleimani MM, Shariatzadeh SMA, Azadpour M. Protective effect of *Nigella sativa* oil on the Bisphenol A induced-testicular toxicity in adult mice (NMRI): a stereological study. *J Cell & Tissue* 2015; 6(1): 87-96.
21. Jorsaraei SGA, Firoozjaee A, Pasha YY, Marzony ET, Sarabi E. Histopathological effects of single dose treatment of diazinon on testes structure in rat. *Yakhteh Med J* 2010; 12(1): 39-42.
22. Al-Sa'aidi JAA, Al-Khuzai ALD, Al-Zobaydi NFH. Effect of alcoholic extract of *Nigella sativa* on fertility in male rats. *Iraqi J Vet Sci* 2009; 23(Suppl II): 123-28.

23. Inci M, Davarci M, Yalcinkaya FR, Nacar E, Aydin M, Sefil NK, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of thymoquinone in a rat model of acute bacterial prostatitis. *Hum Exp Toxicol* 2013; 32(4): 354-61.
24. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol* 2003; 26(2): 87-98.
25. Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Hum Exp Toxicol* 2010; 30(8): 897-903.
26. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Luliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 2014; 16(1): 31-8.

The effects of hydro-alcoholic extract of *Nigella sativa* seed on sperm parameters and spermatogenesis in toxicity induced by diazinon in male rats

Ghasemi R¹, Mir Mohammad Rezaei F^{2*}, Nasri S¹, Nili Ahmadabadi A³

¹Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran, ²Department of Biology, Mazandaran University, Babolsar, Iran, ³Department of Pharmacology and Toxicology, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Received: 8 Mar 2017

Accepted: 4 Sep 2017

Abstract

Background and aim: Organophosphate insecticide diazinon is used in agriculture and may affect fertility of men due to the production of free radicals. Because of the antioxidant properties of black currant compounds, the effect of hydroalcoholic extract of black currant on spermatogenesis in diazinon-induced toxicity in male rats was investigated.

Methods: In the present experimental study, 30 adult male Wistar rats were divided into six groups: control group without sham, corn oil and saline without intervention; the positive control group received Diazinon poison at a concentration of 16 mg / kg. Experimental 1 and 2 respectively received diazinon poison (16 mg / kg) and black and white extract (100 mg / kg) and 200 mg / kg (3 mg / kg) extract, respectively. They received 3 extracts of black currant with a concentration of 200 mg / kg. All treatments were carried out for 2 months in gavage. After 2 months sperm parameters, number, mobility, life and morphology were investigated. Similarly, testicular tissue was stained with Hematoxylin Eosin for evaluation of spermatogenesis after cutting. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Results: Diazinon with a concentration of 16 mg / kg caused a significant decrease in the number and motility of the sperm in comparison to the sham group ($p < 0.01$) ($p < 0.001$), but significantly altered sperm motility and morphology compared to the group. The group that received diazinon and extract of black currant with two concentrations of 100 and 200 mg / kg compared to diazinon group showed a significant increase in the number of sperms ($p < 0.01$) ($p < 0.001$), but blackheads caused a significant change. Sperm motility was not present in the presence of diazinone. Histological examination showed that the number of primary spermatocyte cells and spermatid in the diazinone group compared to sham group decreased significantly ($p < 0.05$). However, the number of spermatogonia cells, primary spermatocytes and spermatid in experimental groups 1 and 2 showed a significant increase compared to diazinon group ($p < 0.05$). In the experimental group 3, the extract increased the number of sperm in comparison with the sham group ($p < 0.05$), but did not change the testicular tissue.

Conclusion: The results indicated that black currant extract had a protective effect on testicular tissue and could increase spermatogonia, spermatocyte, spermatid and sperm count in diazinon-induced toxicity but did not affect sperm motility.

Keywords: Diazinon, *Nigella sativa*, Sperm parameters, Testis

Corresponding author: Mir Mohammad Rezaei F, Department of Biology, Mazandaran University, Babolsar, Iran

Email: fereshteh.mmrezaei@gmail.com

Please cite this article as follows:

Ghasemi R, Mir Mohammad Rezaei F, Nasri S, Nili Ahmadabadi A. The effects of hydro-alcoholic extract of *Nigella sativa* seed on sperm parameters and spermatogenesis in toxicity induced by diazinon in male rats. Armaghane-danesh 2017; 22 (4): 486-498.