مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۲، شماره۴، مهر و آبان ۱۳۹۶(شماره پی در پی۱۲۳)

اثر عصاره هیدروالکلی دانه گیاه سیاهدانه برپارامترهای اسپرمی‌و اسپرماتوژنز در سمیت القاء شده با دیازینون درموش صحرایی نر

ریحانه قاسمی[۱] ، فرشته میرمحمد رضایی[۲*] ، سیما نصری[۱] ، امیر نیلی احمدآبادی[۳]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، [۲]گروه زیست شناسی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، [۳]گروه 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 هیدروالکلی سیاهدانه بر اسپرماتوژنز در سمیت القاء شده با دیازینون درموش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از۳۰ موش نر بالغ نژاد ویستاراستفاده شد که به شش گروه شامل؛ کنترل منفی بدون مداخله گروه شم، روغن ذرت و سالین دریافت کرد، گروه کنترل مثبت، سم دیازینون را با غلظت ۱۶میلی گرم برکیلوگرم دریافت کرد، تجربی ۱و۲ به ترتیب سم دیازینون را با غلظت۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰و۲۰۰ میلی گرم برکیلوگرم دریافت کرد، تجربی ۳ عصاره سیاهدانه با غلظت۲۰۰میلی گرم برکیلوگرم دریافت کرد، تقسیم شدند. تمام تیمارها به مدت ۲ ماه و به صورت گاواژ انجام گرفت. پس از ۲ ماه پارامترهای اسپرمی‌شامل تعداد، تحرک، حیات و مورفولوژی بررسی گردید. هم‌چنین بافت بیضه جهت ارزیابی اسپرماتوژنز پس از برش‌گیری، به وسیله هماتوکسیلین ـ 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 ۱۶میلی گرم بر کیلوگرم سبب کاهش معنی‌داری در تعداد و تحرک اسپرم ها در مقایسه با گروه شم گردید($p<۰/۰۱$)($p<۰/۰۰۱$)، اما تغییر معنی‌داری بر حیات و مورفولوژی اسپرم‌ها در مقایسه با گروه شم نداشت. گروهی که سم دیازینون و عصاره سیاهدانه با دو غلظت۱۰۰و ۲۰۰میلی گرم بر کیلوگرم را دریافت کردند در مقایسه با گروه دیازینون افزایش قابل توجهی در تعداد اسپرم‌ها نشان دادند($p<۰/۰۱$)($p<۰/۰۰۱$)، 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($p<۰/۰۵$). در صورتی که تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در گروه های تجربی ۱و ۲ افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه دیازینون نشان داد($p<۰/۰۵$). در گروه تجربی ۳، عصاره سبب افزایش تعداد اسپرم در مقایسه با گروه شم گردید($p<۰/۰۵$)، اما تغییرمعنی‌داری 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.

واژه های 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 ۴۰-۲۵ 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 فزآینده‌ای به استفاده از آفت‌کش‌ها متکی است(۵). دیازینون از جمله حشره کش های 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 شکل گیری گونه های فعال اکسیژن و اختلال در مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن شود. استرس اکسیداتیو در نتیجه ی عدم تعادل بین آنتی اکسیدان ها و تولیدات ROS در بدن به وجود می‌آید و می‌تواند باعث آسیب به DNA اسپرم، مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم و در نتیجه ناباروری مردان شود. آنتی‌اکسیدان ها، 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 منشاء 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 اسپرمی‌بگذارند(۳). سیاهدانه *Nigella sativa* گیاهی از خانواده آلالگان 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 براسپرم 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 اندام های تولید مثلی را افزایش دهد(۱۲). هم‌چنین مطالعه اثر حفاظتی عصاره متانولی زرشک در آسیب‌های بیضه ناشی از تتراکلرید کربن در موش های 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 دررژیم غذایی افراد به راحتی می‌توانند وارد شوند و اثرات مثبتی بر باروری مردان دارند در این مطالعه برآن 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 اسپرمی‌و 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 درموش صحرایی نر نژاد ویستارمورد 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 هرباریومیHUMZ ۷۸۰۱ شناسایی گردید، سپس جهت عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. عصاره‌گیری

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 ۵±۲۰۰ از پژوهشکده انستیتو پاستور آمل خریداری و در شرایط دمایی ۲۵ـــ۲۳ 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 ۲ماه با روغن ذرت و نرمال سالین گاواژ شد، گروه کنترل مثبت گروهی که ۲ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق گاواژ دریافت کرد، گروه تجربی ۱ گروهی که به مدت ۲ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم و عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به شیوه گاواژ دریافت کرد و گروه تجربی ۲ گروهی که ۲ماه سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم و عصاره ی سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به روش گاواژ دریافت کرد، گروه تجربی ۳ عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به شیوه گاواژ دریافت کرد(جهت بررسی اثرات سمی‌احتمالی عصاره سیاهدانه با بالاترین غلظت گاواژ شد) تقسیم شدند.

سم دیازینون و عصاره سیاهدانه به شیوه گاواژ به حیوانات داده شد به طوری که ابتدا سم دیازینون و پس از ۲ ساعت عصاره سیاهدانه گاواژ گردید. پس از ۲ماه ، حیوانات از طریق تزریق کتامین ـ 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 هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. اپیدیدیم جهت بررسی کیفیت سمن(تحرک 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. داده های جمع آوری 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 ۲ماه 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 برکیلوگرم در حضور سم دیازینون باعث افزایش معنی‌داری در تعداد اسپرم در مقایسه با گروه دیازینون

گردیـد(p<۰/۰۱)(p<۰/۰۰۱)(جـدول۱). هـم‌چنـین در گروه دریافت کننده عصـاره سـیاهدانه بـا غلظـت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعداد اسپرم افـزایش معنـی‌داری را نسـبت بـه گـروه شـم نشـان داد(p<۰/۰۵). تحـرک اسپرم در گـروه دریافـت کننـده ی سـم دیـازینون بـا غلظت ۱۶ میلی‌گرم برکیلـوگرم نسـبت بـه گـروه شـم کاهش معنی‌داری را نشان داد(p<۰/۰۰۱).

هم‌چنین گروه دریافت کننده عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلـوگرم تغییـر معنـی‌داری در تحرک اسپرم در مقایسه با گروه شـم نشـان نـداد. در گروه‌هایی که سم دیازینون و عصاره سیاهدانه بـا غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم دریافـت کـرده بودنـد، تغییـری در تحـرک اسـپرم نسـبت بـه گـروه دیازینون مشاهده نشد. از طرف دیگر بین اثر عصـاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گـرم بـر کیلـوگرم در حضور دیازینون تغییر معنی‌داری در تعداد اسپرم و تحرک اسپرم مشاهده نشد(جدول۱) .

تصاویر میکروسکوپی از رنگ‌آمیزی ائوزین ـ نیگروزین نشـان داد کـه سـم دیـازینون بـا غلظـت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلـوگرم و عصـاره سـیاهدانه در هـر دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گـرم بـر کیلـوگرم در حضـور دیـازینون تغییـر معنـی‌داری در حیـات اسـپرم‌هـا و مورفولـوژی اسـپرم ایجـاد نکـرد. هـم‌چنـین عصـاره سیاهدانه در غلظـت ۲۰۰ میلـی‌گـرم بـر کیلـوگرم نیـز تغییر معنی داری بر حیـات و مورفولـوژی اسـپرم در مقایسه با گروه شم نشان نداد.

هم‌چنین مطالعـه‌هـای بـافتی نشـان داد کـه در گـروه دریافـت کننـده سـم دیـازینون بـا غلظـت ۱۶ میلـی‌گـرم بـر کیلـوگرم تعـداد سـلول اسـپرماتوگونی نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری نداشت. در حالی کـه گـروه دریافـت کننـده سـم دیـازینون و عصـاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم در مقایسه با گروه دیازینون افزایش معنی‌داری در تعـداد سلول اسپرماتوگونی نشان داد(p<۰/۰۵). هم‌چنین در گروه دریافت کننده عصـاره سـیاهدانه بـا غلظـت ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شـم تغییـری در تعـداد سـلول اسـپرماتوگونی مشـاهده نشـد. (جدول۲)(شکل ۱). هم‌چنین تعداد سلول اسپرماتوسیت اولیه در گروه دریافت کننده سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شم کـاهش قابـل توجهی نشان داد(p<۰/۰۵). در صورتی که سلول‌هـای اسپرماتوسیت اولیه در گروه‌های دریافـت کننـده سـم دیـازینون و عصـاره سـیاهدانه بـا غلظـت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم نسبت به گروه دیازینون افـزایش معنی‌داری را نشان دادند(p<۰/۰۵)(جدول۲)(شـکل ۱). هم‌چنین در گروهی که به مدت ۲ماه سم دیـازینون بـا غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلـوگرم دریافـت کـرده بودنـد تعداد اسپرماتید نسبت به گروه شم کاهش معنـی‌داری نشـان داد(p<۰/۰۵). گـروه‌هـای دریافـت کننـده سـم دیـازینون و عصـاره سـیاهدانه بـا غلظـت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه بـا گروهـی کـه سـم دیازینون دریافت کرده بود افـزایش قابـل تـوجهی در

تعداد اسپرماتید نشـان دادنـد(p<۰/۰۵). هـم‌چنـین در مطالعه بافتی بین اثر عصاره سیاهدانه با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم برکیلوگرم در حضور دیـازینون تغییـر معنـی‌داری در تعـداد اسـپرماتوگونی، اسپرماتوسـیت اولیه و اسپرماتید مشاهده نشد(جدول۱) .

در گروه دریافت کننده عصاره سیاهدانه با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شم تعداد سلول اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در مقایسه با گروه شم افزایش معنی داری نشان نداد. (جدول۲) (شکل ۱).

جدول ۱ : اثر عصاره سیاهدانه با غلظت های ۱۰۰و۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر تعداد و تحرک اسپرم در سمیت القاء شده با دیازینون
نتایج به صورتMean ± SD بیان شده است . اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم

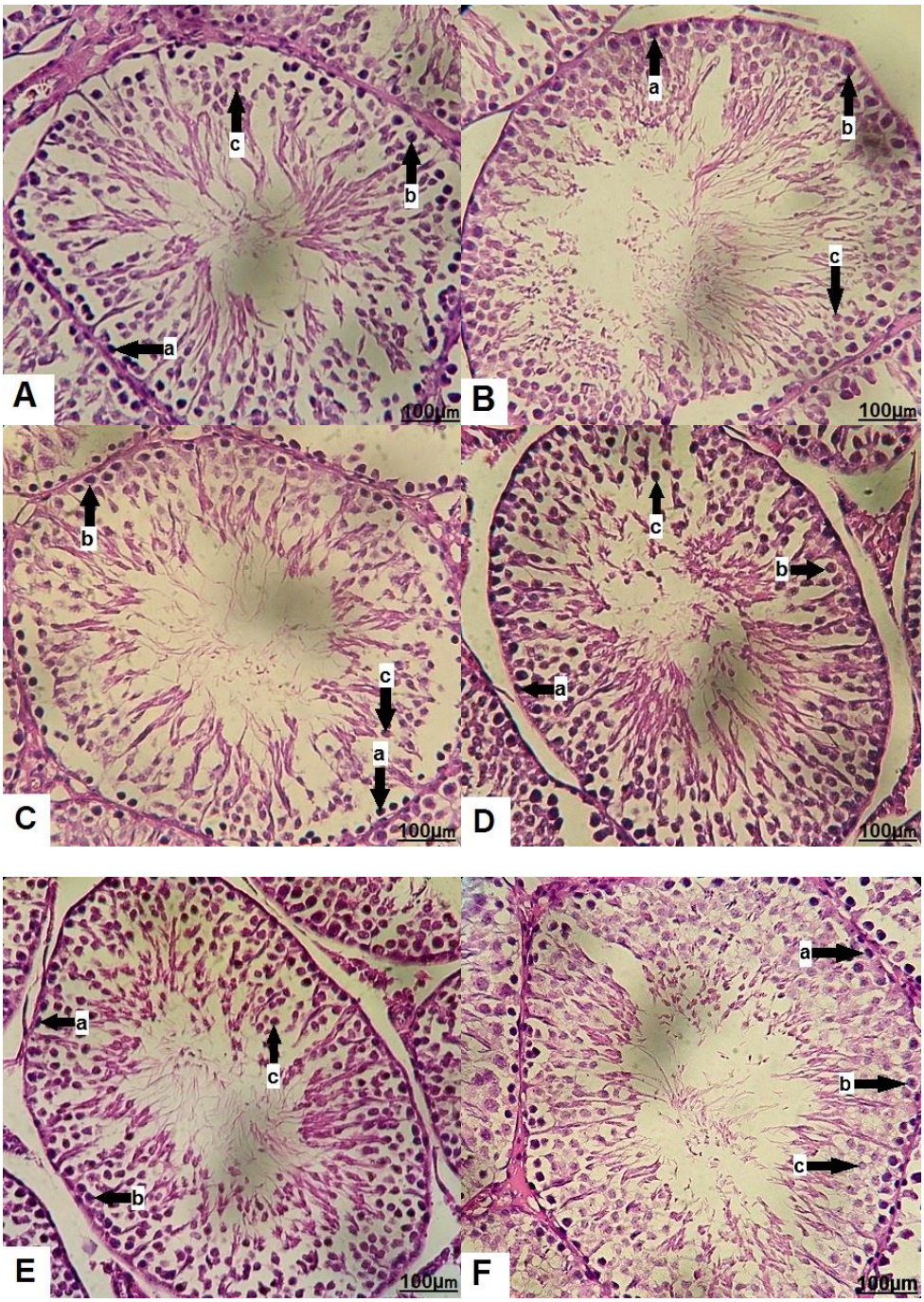
(P<۰،۰۰۱) ×××، (P<۰،۰۱) ××، (p<۰/۰۵)* اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه دیازینون (P<۰،۰۰۱)+++، (P<۰،۰۱)++

گروهها	تعداد اسپرم($۱۰^۶$ ×)	تحرک اسپرم
کنترل	۱۰۵/۲۵±۲۱/۰۷	۴۵/۶۸±۰/۹۶
شم (روغن ذرت + سالین)	۱۴۷/۱۲±۲۹/۴۵	۳۹/۸۵±۵/۴۹
دیازینون(۱۶ میلی گرم بر کیلوگرم)	۴۶/۶۶±۸/۷۱**	۵/۱±۱/۲۵***
دیازینون + عصاره سیاهدانه(۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)	۱۴۰/۶۸±۳۳/۲۳++	۵/۰۶±۱/۱۰
دیازینون + عصاره سیاهدانه(۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)	۱۷۳/۲۵±۴۲/۹۲+++	۲/۶۳±۰/۷۴
عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم)	۱۶۱/۲±۱۷/۶۵*	۳۶/۰۶±۴/۶۷

جدول ۲: اثر عصاره سیاهدانه با غلظت های ۱۰۰و۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم برتعداد سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید در سمیت القاء شده با دیازینون

نتایج به صورتMean±SD بیان شده است، اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه شم(p<۰/۰۵)* اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه دیازینون (p<۰/۰۵)+

گروهها	تعداد اسپرماتوگونی	تعداد اسپرماتوسیت اولیه	تعداد اسپرماتید
کنترل	۳۷/۷۱±۷/۶۶	۵۳/۲۵±۱۲/۳۶	۱۵۲/۰۸±۳۴/۹۳
شم (روغن ذرت + سالین)	۴۳/۲۳±۸/۶۷	۶۳/۱۸±۱۰/۶۷	۱۷۱/۶۸±۲۹/۲۱
دیازینون(۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۳۶/۷۵± ۵/۲۴	۴۲/۲۰±۷/۷۱*	۱۴۰/۸۸±۲۵/۳۳×
دیازینون + عصاره سیاهدانه ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۴۸/۵ ±۸/۴۵+	۶۷/۵± ۱۲/۶۹ +	۱۷۶±۳۰/۱۳+
دیازینون + عصاره سیاهدانه(۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۴۶/۵±۱۰/۵۵ +	۷۰/۳۵±۱۰/۸۸ +	۱۶۶/۴۲± ۲۶/۵۱+
عصاره سیاهدانه (۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	۴۲/۲۳±۵/۶۷	۶۸/۹±۱۲/۸۴	۱۶۹/۹۶±۳۵/۱۹



شکل ۱ : تصاویر میکروسکوپی بافت بیضه در حضور دیازینون و عصاره سیاهدانه با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم (۴۰×). A گروه کنترل، B گروه شم، C گروه دیازینون (۱۶میلی گرم بر کیلوگرم)، D گروه دیازینون + عصاره سیاهدانه (۱۰۰میلی 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

در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی دانه سیاهدانه بر شاخص‌های باروری موش های صحرایی در سمیت القاء شده با دیازینون مورد بررسی قرار گرفت. بررسی منی نشان داد که سم دیازینون با غلظت ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۲

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 سرمی‌تستوسترون باشد(۱۴). سموم ارگانوفسفره با اثر بر سیستم اندوکرینی می‌توانند سطوح هورمون‌های استروییدی 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 و۱۵). در این مطالعه بررسی مایع منی نشان داد که مصرف خوراکی عصاره سیاهدانه با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سبب افزایش قابل توجهی در تعداد اسپرم‌های موش‌هایی شد که به مدت ۲ماه 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 نتایج هالا و همکاران مشخص کرد که دریافت روغن سیاهدانه به مدت ۴ هفته دارای اثر حفاطتی در برابر آسیب بیضه ای 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 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 اسپرم ها 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 ۲ماه تغییری در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی ایجاد نکردریا، اما کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه و اسپرماتید در مقایسه با گروه شم 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 جورسرایی و همکاران نشان دادند که تجویز دوزهای ۲۵ میلی گرم 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 دریافت کننده دیازینون با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به طور قابل توجهی پایین تر از غلظت ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم بوده است(۲۱). تجویز دراز مدت سم دیازینون می‌تواند بر بافت بیضه تأثیر

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 غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در حضور دیازینون در مطالعه‌های بافتی مشاهده نشد. احمد الساعدی و همکاران نشان دادند که استفاده از سیاهدانه منجر به بهبود اسپرماتوژنز 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(۲۴ و۲۳). به نظر می‌رسد در این مطالعه نیز سیاهدانه با فعالیت آنتی اکسیدانی 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 پراکسیدسیون 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 اسپرم ها تأثیر بگذارد و باعث کاهش تحرک شود. در مطالعه حاضر بررسی تحرک اسپرم نشان داد که عصاره سیاهدانه اثر مثبتی بر تحرک اسپرم هایی 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 نتواتست آسیب سم دیازینون بر تحرک اسپرم را بهبود بخشد. بنابراین مطالعه‌های بعدی نیاز به بررسی هم‌زمان ترکیب‌های گیاهی و آنتی اکسیدانی 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 می‌نماییم.

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, Nikravesh 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 sterptozotocine 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 Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. Asian J Androl 2014; 16(1): 31-8.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

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

Ghasemi R[1], Mir Mohammad Rezaei F[2*], Nasri S[1], Nili Ahmadabadi A[3]

[1]Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran, [2]Department of Biology, Mazandaran University, Babolsar, Iran, [3]Department 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 Did not have you 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.