

اثر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina.L*) بر بافت بیضه و روند اسپرم‌سازی در موش‌های صحرایی نر تیمار شده با تتراکلریدکربن

زهره سلیمانی، ناصر میرازی*

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۴

چکیده:

زمینه و هدف: مسمومیت با تتراکلریدکربن سبب تولید رادیکال‌های آزاد در بافت‌های بدن از جمله بیضه می‌گردد. گیاهان دارویی از زمان قدیم در طب سنتی کاربرد وسیعی برای درمان بیماری‌ها داشته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی عصاره برگ گیاه حرا بر روند اسپرماتوژنز موش‌های صحرایی القاء شده با تتراکلریدکربن بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۴۲ سر موش صحرایی به شش گروه کنترل (دریافت‌کننده سالین نرمال)، شش (دریافت‌کننده روغن زیتون)، گروه القا شده به وسیله تتراکلریدکربن (دریافت‌کننده مقدار ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن با درصد ۱:۱ با روغن زیتون به صورت تک دوز) و تیمار ۱، ۲ و ۳ (دریافت‌کننده مقدار ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلریدکربن با درصد ۱:۱ با روغن زیتون به صورت تک دوز و عصاره با دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روزانه) تقسیم شدند. تزریق عصاره به صورت داخل صفاقی و دو ساعت پس از تزریق تتراکلریدکربن به مدت ۴ روز متوالی انجام شد. در پایان آزمایش‌ها وزن بیضه‌ها، تعداد و درصد تحرک اسپرم‌های اپیدیدیمی مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده از این مطالعه حاکی از آن است که تعداد اسپرم‌ها و تحرک آنها در گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0/01$). همچنین تتراکلریدکربن به طور گسترده‌ای بافت بیضه را دچار نکروز نمود ($P < 0/01$). نسبت وزن بیضه به بدن در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره نسبت به گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری: عصاره برگ گیاه حرا به دلیل داشتن ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی دارای اثر محافظتی در برابر اثرات توکسیک تتراکلریدکربن است.

کلیدواژه: گیاه حرا، اسپرماتوژنز، تتراکلریدکربن، موش صحرایی

* نویسنده مسئول: ناصر میرازی، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

Email: mirazi205@gmail.com

مقدمه

مسائل مربوط به باروری و ناباروری یکی از مسائل پیچیده در علم پزشکی است. در هر اجتماعی تقریباً ۱۳ درصد افراد نابارور هستند که در این بین شایع‌ترین علت ناباروری در مردان و عدم توانایی آنان در تولید اسپرم‌های سالم و فعال است (۱ و ۲). اختلال در تولید و عملکرد اسپرم و آسیب در روند اسپرماتوژنز، از شایع‌ترین علل ناباروری مردان به شمار می‌رود. از میان این عوامل می‌توان به مصرف داروهای مخصوص در شیمی‌درمانی، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد سمی، آفت‌کش‌ها و غیره اشاره نمود. مشخص شده است که این عوامل می‌توانند با ایجاد رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون سلول‌های ژرمینال جنسی در بافت بیضه تعداد اسپرم را کاهش دهند. استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدها و تغییر خاصیت غشایی باعث ایجاد مرگ سلول‌های زایا در مراحل مختلف اسپرماتوژنز و در نتیجه کاهش تعداد اسپرم‌ها می‌گردد (۳).

تتراکلریدکربن یک ترکیب آلی با فرمول CCl_4 می‌باشد که در صنایع بهداشتی به کار می‌رود و مسمومیت با تتراکلریدکربن سبب تولید رادیکال‌های آزاد در بافت‌های بدن از جمله بیضه می‌گردد (۴). تتراکلریدکربن تحت اثر آنزیم‌های سیتوکروم P_{450} به محصولات سمی و واکنش‌گر رادیکال تری کلرومتیل سلولی مانند؛ اسیدنوکلیک، پروتئین و لیپید متصل می‌شود و فرآیندهای سلولی مانند متابولیسم چربی‌ها

را به شدت تخریب می‌کند. همچنین این رادیکال با اکسیژن واکنش می‌دهد و رادیکال پراکسی تری کلرومتیل ($CCl_3O_2^0$) که یک گونه بسیار فعال است را ایجاد می‌کند. پراکسی تریکلرومتیل واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون لیپیدها را به شدت تخریب کرده و متعاقب آن آسیب سلولی سنگینی را به دنبال خواهد داشت (۶).

در میان آنتی‌اکسیدان‌های موجود، امروزه منابع گیاهی توجه بسیاری از پژوهش‌گران را جلب کرده است و با توجه به آثار سوء و عوارض عوامل شیمیایی، امروزه استفاده از طب سنتی به خصوص گیاه درمانی مد نظر قرار گرفته شده است (۱).

گونه حرا (*Avicennia*) از تیره شاه پسند جنس (*Avicennia marina*) می‌باشد. این گونه به عنوان یکی از غالب‌ترین گونه‌های گیاهی اکوسیستم مانگرو می‌باشد که نسبت به سایر گونه‌ها بیشترین مقاومت را نسبت به تغییرات دمای هوا و میزان شوری نشان می‌دهد (۸ و ۷). گونه حرا گیاهی درختی-درختچه‌ای با شاخه و برگ زیاد و همیشه سبز است. برگ‌های نیزه‌ای و بیضی شکل دارد که در سطح رویی سبز براق و در سطح زیرین دارای پرزهای زیاد و سفید رنگ می‌باشد. پوشش انبوه گیاه حرا با داشتن یک تاریخچه طولانی از اثرات درمانی در مرز جنوبی ایران حایز اهمیت بوده است (۹). این گیاه دارای فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی می‌باشد و در مصر به طور سنتی برای درمان بیماری‌های پوستی به کار می‌رود. از فعالیت‌های بیولوژیکی آن می‌توان به پیشگیری از بار

روش بررسی

در این مطالعه تجربی تعداد ۴۲ سر موش صحرایی نر از انستیتو پاستور تهران تهیه شد و به مدت یک هفته در حیوان خانه در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۵-۶۰ درصد و میزان نور) ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) قرار داده و آب و غذا به میزان کافی در اختیار حیوانات قرار داده شد تا به وزن دلخواه حدود ۲۵۰-۲۲۰ گرم برسند. در نهایت موش‌ها به شش گروه ۷ سری شامل؛ کنترل، شم، گروه القا شده به وسیله تتراکلریدکربن، تیمار ۱، ۲ و ۳ به طور تصادفی تقسیم شدند. گروه‌های تیمار توسط تتراکلرید کربن مقدار (۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلرید کربن و تک دوز) با درصد ۱:۱ با روغن زیتون القاء شدند و دو ساعت بعد به ترتیب عصاره هیدروالکی برگ گیاه حرا با دوزهای (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) روزانه و به مدت ۴ روز متوالی به روش تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد مقدار ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلرید کربن با درصد ۱:۱ با روغن زیتون به صورت تک دوز دریافت نمودند. گروه کنترل و شم به ترتیب نرمال سالین روزانه و روغن زیتون (تک دوز) به میزان ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم و به طور داخل صفاقی دریافت کردند. در پایان آزمایش‌ها وزن بیضه‌ها، تعداد و درصد تحرک اسپرم‌های اپیدیدیمی مورد بررسی قرار گرفت. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی و همچنین کمیته اخلاق کار با

داری، درمان رماتیسم، ضد سرطان، ضد میکروبی و ضد توموری اشاره کرد (۱۰). فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد باکتریایی، ضد قارچ و محافظت کبدی از دیگر فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه حرا می‌باشد (۱۱). ترکیبات آن شامل انواع گروه‌های محصول طبیعی از جمله؛ مشتقات نفتالین، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و استروئیدها می‌باشد (۹). فلاونوئیدها از بزرگترین گروه از پلی فنول‌ها است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند و بر اساس ساختار مولکولی شامل گروه‌های مختلفی از آنتوسیانین‌ها است. مشخص شده است که مصرف غذاهای غنی از ترکیب‌های پلی‌فنول‌ها می‌تواند سطح آنتی‌اکسیدان در خون را افزایش دهد. ترکیب‌ها و مشتقات شناسایی شده از فلاونوئیدهای موجود در سرشاخه‌ها و برگ‌های گیاه حرا دارای مواد جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۱۲).

با توجه به این که تاکنون تحقیقی در مورد اثر مثبت گیاه حرا بر اسپرماتوزن در رت‌های القا شده با تتراکلرید کربن انجام نگرفته است. با توجه به ترکیب‌های بیولوژیکی فعال موجود در گیاه حرا، وجود اکوسیستم بسیار غنی مانگرو و نحوه رویش منحصر به فرد این گیاه در جنوب ایران، هدف از این مطالعه بررسی عصاره برگ گیاه حرا در روند اسپرماتوزن در موش‌های صحرایی نر القاء شده با CCl_4 و تأثیر آن در پیشگیری از اثرات سوء CCl_4 بر بافت بیضه بود.

حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام گردید. فرآیند عصاره‌گیری در این مطالعه بر اساس منابع قبلی انجام شد (۱۳). در این مطالعه ابتدا گیاه حرا از منطقه قشم تهیه و شناسایی علمی آن به وسیله کارشناس گیاه شناس انجام گرفت. برگ‌های گیاه حرا شسته، کاملاً در سایه خشک شده و به صورت پودر درآورده شد. سپس پودر آن (۱۸۰ گرم) را در ۵۶۰ سی سی الکل اتانول ۸۰ درصد (۸۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۶ درجه + ۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر) شناور نموده و پس از آن که به مدت ۴۸ ساعت در یخچال قرار گرفت، محلول رویی با کاغذ صافی جدا شد و مجدداً بر روی تفاله‌های گیاه ۲۵۰ سی‌سی اتانول ۷۵ درصد ریخته شد و پس از طی ۲۴ ساعت محلول رویی جدا و دو محلول با هم مخلوط شدند. محلول حاصل به وسیله دستگاه روتاری در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد تا الکل آن کاملاً باز تبخیر شود و عصاره هیدروالکلی به دست آید. عصاره هیدروالکلی به پتری دیش انتقال یافت و سپس در زیر هود به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. عصاره حاصل تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شد.

تهیه مقاطع میکروسکوپی و شمارش اسپرم در این مطالعه بر اساس منابع قبلی انجام شد (۱۵ و ۱۴). بعد از پایان آزمایش‌ها، حیوانات بیهوش شدند و با ایجاد یک برش طولی در اسکروتوم، اندام‌های تناسلی دو طرف شامل؛ بیضه، اپیدیدیم و ازودفران به دقت خارج گردیده و توزین شدند و مورد

مطالعه‌های میکروسکوپی قرار گرفتند. سپس بافت بیضه در فرمالین ۱۰ درصد فیکس و مقاطع میکروسکوپی از بیضه تهیه و با هئاتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شد. بلافاصله پس از جدا کردن اپیدیدیم نیمه انتهایی اپیدیدیم (بدنه و دم) در سرم فیزیولوژی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از قطعه قطعه کردن اپیدیدیم و خروج اسپرم‌ها ۱۰ میکرولیتر از محلول حاصل با ۹۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی مخلوط شد. سپس یک قطره از محلول حاصل روی لام نئوبار قرار داده و تعداد اسپرم‌ها در پنج مربع شانزده خانه‌ای از وسط لام شمارش گردید و میانگین آنها محاسبه شد. تحرک اسپرم‌ها نیز در زیر میکروسکوپ به طور تقریبی تخمین زده شد و در صد آن‌ها تعیین گردید. هم‌چنین نسبت وزن بیضه به وزن بدن (GSI) به عمل آمد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف مشخص شد که توزیع همه متغیرهای موجود در پژوهش طبیعی می‌باشد. بنابراین از آزمون‌های پارامتریک برای انجام محاسبه‌های آماری استفاده گردید. نتایج به دست آمده از این مطالعه حاکی از آن است که تعداد اسپرم‌ها در گروه شاهد (دریافت‌کننده CCl_4) کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($p < 0.01$). از طرفی

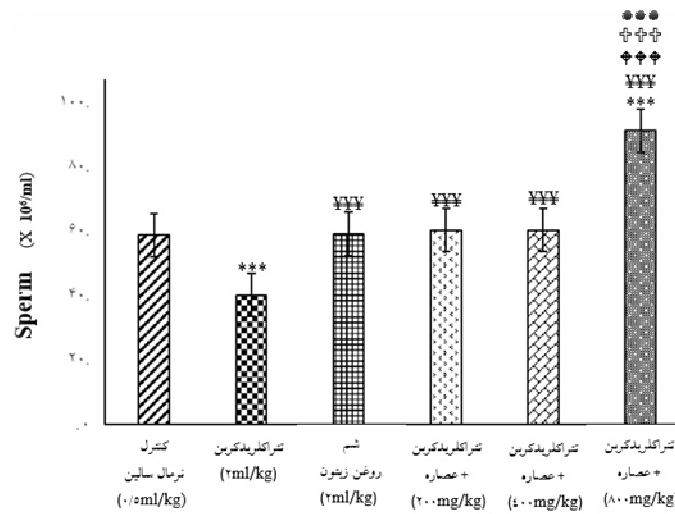
دوزهای (۲۰۰ و ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) منجر به افزایش معنی‌دار نسبت وزن بیضه به وزن بدن در مقایسه با گروه دریافت‌کننده CCl_4 بوده است (جدول ۳).

نتایج بافت‌شناسی نشان داد برش عرضی از بیضه گروه کنترل، تمامی رده‌های سلولی را به طور کامل و منظم در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. همچنین لوله‌های سمینیفروس در کنار یکدیگر قرار گرفته و فضای مابین لوله‌ها در حد طبیعی است. شکل (A۱) برش عرضی از بیضه در گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن بیانگر اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، شم و گروه دریافت‌کننده عصاره است به طوری نشان می‌دهد که تعداد لایه‌های سلول‌های نسل اسپرماتوژنز آن کاهش معنی‌داری یافته و نظم و ارتباط بین سلولی به هم خورده است. همچنین فضای میان لوله‌های سمینیفروس به طور معنی‌داری افزایش یافته است که خود نشان از آتروفی لوله‌های سمی نیفر می‌باشد ($p < 0/01$) (شکل B۱). برش عرضی از بیضه گروه دریافت‌کننده عصاره برگ گیاه حرا بیانگر اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن است. به طوری که مشاهده می‌شود که سلول‌ها به صورت منظم در کنار یکدیگر قرار داشته و فضای مابین لوله‌های سمینیفروس در حد طبیعی است. (شکل C۱) در برش عرضی از بیضه گروه شم (دریافت‌کننده روغن زیتون)، مشابه گروه کنترل تمامی رده‌های سلولی به طور طبیعی مشاهده می‌شود و بافت بیضه حالت طبیعی را نشان می‌دهد (شکل D۱).

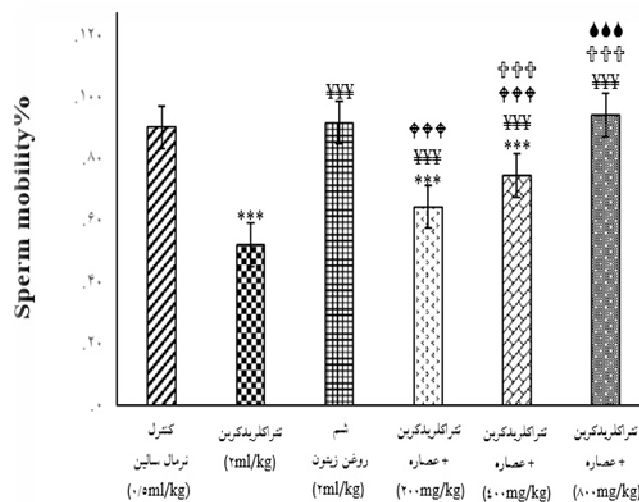
مقایسه بین گروه شم (دریافت‌کننده روغن زیتون) و گروه‌های دریافت‌کننده CCl_4 + عصاره هیدروالکی برگ گیاه حرا در دوزهای (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) با گروه دریافت‌کننده CCl_4 بیانگر اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها بوده است و دریافت عصاره منجر به افزایش معنی‌دار تعداد اسپرم‌ها نسبت به گروه دریافت‌کننده CCl_4 شده است. در نهایت مقایسه بین گروه دریافت‌کننده CCl_4 + عصاره هیدروالکی برگ گیاه حرا به میزان ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با گروه‌های کنترل، شم (دریافت‌کننده روغن زیتون) و گروه‌های دریافت‌کننده CCl_4 + عصاره هیدروالکی برگ گیاه حرا در دوزهای (۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیانگر افزایش معنی‌دار بین آن‌ها بوده است (نمودار ۱).

در بررسی داده‌های حاصل از سنجش تحرک اسپرم، مقایسه بین گروه دریافت‌کننده CCl_4 با گروه کنترل، شم (دریافت‌کننده روغن زیتون) و گروه‌های تحت تیمار با عصاره برگ گیاه حرا بیانگر افزایش معنی‌دار بین آن‌ها بوده و دریافت CCl_4 منجر به کاهش تحرک اسپرم نسبت به گروه‌های فوق شده است. از طرفی دریافت عصاره برگ گیاه حرا سبب افزایش معنی‌دار تحرک اسپرم نسبت به گروه دریافت‌کننده تتراکلریدکربن شده است (نمودار ۲).

علاوه بر این نتایج این مطالعه نشان داد نسبت وزن بیضه به وزن بدن (GSI) در حیوانات القاء شده با تتراکلریدکربن به طور معنی‌داری کمتر از گروه‌های کنترل و تیمار شده با عصاره برگ گیاه حرا بود ($p < 0/01$). و دریافت عصاره برگ گیاه حرا در



نمودار ۱: داده‌های حاصل از شمارش اسپرم در موش‌های صحرایی نر. * بیان‌گر معناداری نسبت به گروه کنترل، † بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ‡ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه شم، †† بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ††† بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، †††† بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۱۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. (***): $p < 0.001$ (††††): $p < 0.0001$ (†††): $p < 0.001$ (††): $p < 0.01$ (†): $p < 0.05$ (NS): $p > 0.05$ (●●●): $p < 0.001$

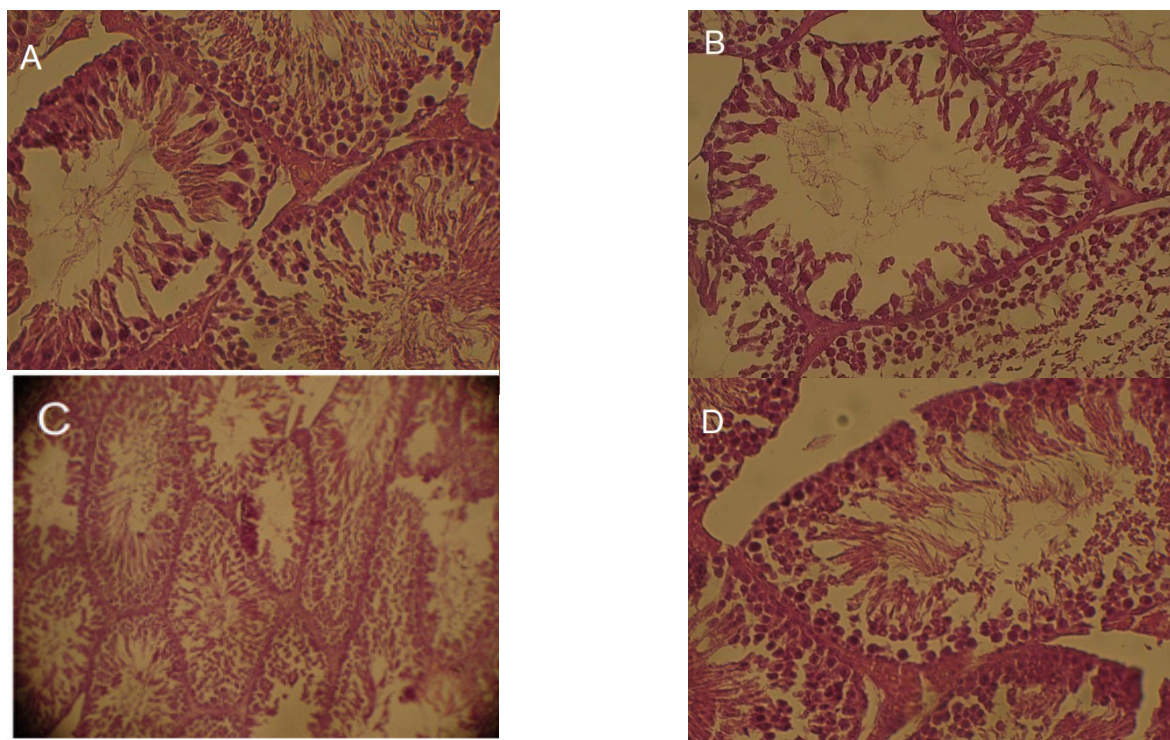


نمودار ۲: بررسی داده‌های حاصل از سنجش تحرک اسپرم در موش‌های صحرایی نر. * بیان‌گر معناداری نسبت به گروه کنترل، † بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ‡ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه شم (دریافت‌کننده روغن زیتون)، †† بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ††† بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، †††† بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۱۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. (***): $p < 0.001$ (††††): $p < 0.0001$ (†††): $p < 0.001$ (††): $p < 0.01$ (†): $p < 0.05$ (●●●): $p < 0.001$

جدول ۳: بررسی داده‌های حاصل از سنجش GSI در موش‌های صحرایی نر. * بیانگر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، † بیانگر معنی‌داری نسبت به گروه دریافت‌کننده CCl₄† بیانگر معنی‌داری نسبت به گروه دریافت‌کننده دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

نسبت وزن بیضه به وزن بدن (GSI) (X 10 ³)	کنترل (۰/۵ میلی لیتر)	تتراکلرید کربن (۲ میلی لیتر بر کیلوگرم)	شَم (۲ میلی لیتر بر کیلوگرم)	تتراکلرید کربن+عصاره (۲۰۰ میلی لیتر بر کیلوگرم)	تتراکلرید کربن+عصاره (۴۰۰ میلی لیتر بر کیلوگرم)	تتراکلرید کربن+عصاره (۸۰۰ میلی لیتر بر کیلوگرم)
میانگین ± انحراف معیار	۱۵/۴۸±۰/۱۰	۹/۴۰±۰/۱۰	۱۵/۶۵±۰/۰۸	۱۴/۲۸±۰/۳۴	۱۵/۰۸±۰/۲۸	۱۵/۷۰±۰/۵۴
		<۰/۰۰۱ ***	N.S	N.S	N.S	N.S
سطح معنی‌داری			<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***
						<۰/۰۰۱ ***
						†
						N.S

(† p<۰/۰۵) (p<۰/۰۰۱) (***) (p<۰/۰۰۱)



شکل ۱: فتومیکروگراف مقاطع بافتی بیضه گروه‌های آزمایشی (بزرگنمایی X ۱۰۰، رنگ‌آمیزی) هماتوکسیلین+ ائوزین، A- گروه کنترل (دریافت‌کننده سالین نرمال)، B- گروه شاهد (دریافت‌کننده تتراکلرید کربن)، C- گروه تیمار (دریافت‌کننده عصاره برگ گیاه حرا با دوز مصرفی ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، D- گروه شَم (دریافت‌کننده روغن زیتون)

بحث

می‌گردد. به طوری که که تتراکلرید کربن در این مطالعه به شدت منجر به تغییرات بافت بیضه و کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم و قابلیت تحرک اسپرم می‌شود. از آنجایی که سلول‌های سرتولی نقش مهمی در تنظیم میزان اسپرماتوژنز و تغییر در اسپرم تولید شده دارند (۱۷). این احتمال می‌رود که تتراکلرید کربن با تولید ROS و پراکسیداسیون لیپیدی بر سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتوگونی‌ها، لیدیک و سرتولی منجر به تغییرات روند اسپرماتوژنز و تخریب بافت بیضه می‌شود. علاوه بر این نسبت وزن بیضه به وزن بدن نیز در حیوانات مواجه شده با تتراکلرید کربن کاهش نشان می‌دهد.

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیب‌هایی هستند که به کنترل ROS و پراکسیداسیون لیپیدی کمک می‌کنند. فلاونوئیدها محصولات متابولیسم گیاه می‌باشند و دارای ساختار فنلی متفاوتی هستند. آنها به دلیل خواص مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌های مؤثری هستند، در نتیجه ممکن است بافت‌ها را در برابر رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند (۱۶). این ترکیب‌های مهم در گیاهان حرا وجود دارند. به طوری که در مطالعه فتحی مقدم و همکاران گزارش دادند که با افزایش استرس اکسیداتیو فعالیت آسکوربیت پراکسیداز (APX) در برگ‌های این گیاه ایجاد می‌گردد که نقش مهمی در کاهش اثرات زیان بار استرس اکسیداتیو دارد (۱۲).

رادیکال‌های آزاد، اتم‌ها یا مولکول‌هایی با الکترون جفت نشده هستند که قادرند به طور برگشت‌ناپذیر به مولکول‌های سیستم‌های بیولوژیک نظیر؛ اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه آزاد، لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و ماکرومولکول‌های بافت هم‌بند آسیب وارد نمایند. سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل عوامل آنزیمی نظیر؛ سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز می‌باشد که به ترتیب رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و پراکسیدهای آلی را درون سلول‌ها خنثی می‌کند. همچنین در این سیستم عوامل غیر آنزیمی شامل؛ پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، فورانوکومارین‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان در خنثی‌سازی بسیاری از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن دخالت دارند (۱۶ و ۳).

گونه فعال اکسیژن (ROS) مولکولی است که به شدت موجب اختلال عملکرد سلولی شده و رادیکال‌های آزاد دارند. گونه فعال اکسیژن در بیضه‌ها به عنوان یک رویداد فیزیولوژیکی تولید می‌شوند. مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که تغییر در سنتز تحریک ROS و تعادل نامناسب تولید ROS، سبب آسیب DNA و اکسیداسیون سلولی در منی می‌شود (۳).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تزریق درون صفاقی تتراکلرید کربن سبب مسمومیت بافت بیضه

احیاء، با افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون، گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پراکسید و کاتالاز محافظت نمایند (۱۹). در مطالعه حاضر گروه دریافت‌کننده گیاه حرا افزایش معنی‌داری در وزن بدن و بیضه داشتند. از آنجایی که وزن بدن و بیضه‌ها تحت تأثیر هورمون تستوسترون می‌باشد احتمالاً عصاره گیاه حرا منجر به افزایش قابل ملاحظه هورمون تستوسترون در این مطالعه شده و متعاقب آن افزایش تعداد سلول‌های لایدیگ و سلول‌های جنسی اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت و اسپرماتیدها این مسئله کاملاً قابل توجیه است. از آنجایی که این مطالعه تجربی بر روی گروهی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار انجام گردید با محدودیت‌های زمانی مواجه شد. اگر شرایط برای ادامه کار با افزایش زمان درمان فراهم بود قطعاً نتایج قابل قبول‌تری حاصل می‌گردید. همچنین عدم وجود امکانات لازم جهت مطالعه‌های مولکولی در سلول و تغییرات آنزیمی موجود در سلول‌های روند اسپرماتوژنز، ابهاماتی را در نتایج این مطالعه ایجاد می‌نماید. در صورت تأمین امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی این مهم نیز قابل انجام خواهد شد، لذا به منظور افزایش دقت در این نوع مطالعه پیشنهاد می‌شود تا ادامه کار با استفاده از روش‌های سلولی - مولکولی همراه گردد.

اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره بسیاری از گیاهان از جمله خارمریم، کاسنی، شیرین بیان، همیشه بهار و شاه‌تره اثبات شده است برخی عصاره‌های خام گیاهی مورد استفاده در طب سنتی، منبعی غنی از ترکیب‌های با خواص پیشگیری‌کننده و حفاظت‌کننده در بافت‌های بدن هستند. هیندربرگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخی از سبزی‌ها و ادویه‌ها (ریحان، برگ بو، جعفری، سروکوهی، تخم بادیان، رازیانه، زیره سبز، هل و زنجبیل) را بررسی کردند و گزارش نمودند که عصاره ریحان قدرت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارد (۱۸). این نتایج را می‌توان به برگ گیاه حرا نیز تعمیم داد، زیرا خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریال آن گزارش شده است.

در مطالعه حاضر گیاه حرا با وجود دارا بودن ترکیب‌های متعدد و متفاوت می‌تواند اثرات زیادی را از خود نشان دهد. به طوری که مشخص گردید تیمار با عصاره هیدروآتانولی برگ گیاه حرا موجب حفاظت سلول‌های بافت بیضه در برابر اثرات اکسیدانی CCl_4 و تغییر در ساختار و عملکرد بافت بیضه می‌شود. احتمالاً این اثر به واسطه وجود ترکیب‌های پلی‌فنلی به خصوص فلاونوئیدها می‌باشد. در مطالعه‌ای مشخص شد این ترکیب‌ها همچنین به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی قادر به خنثی نمودن رادیکال‌های آزاد موجود در محیط شده و جلوگیری از اثرات مخرب آنها می‌شود (۱۲). ترکیب‌های پلی‌فنلی و فلاونوئیدها، همچنین می‌توانند سلول را در برابر تخلیه گلوتاتیون

نتیجه‌گیری

عصاره برگ گیاه حرا دارای اثر محافظتی در برابر اثرات توکسیک تتراکلریدکربن است، زیرا حاوی ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی است و با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد عصاره هیدروالکلی گیاه حرا بر روند اسپرما توژنز تأثیر مثبت داشته است.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی مصوب دانشگاه بوعلی سینا همدان بود که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شد.

REFERENCES

1. Hatami L, Estakhr J. The effects of hydroalcoholic extract of *matricaria recutita* on the hormonal pituitary-testis axis and testis tissue changes of mature male rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* Spring 2013 ;3(1):56-62.
2. Faraji Z, Nikzad H, Parivar K, Nikzad M. The effect of aqueous extract of Salep Tubers on the structure of testis and sexual hormones in male mice. *Journal Jahrom University Medical Sciences* 2013; 11(1): 71-6.
3. Khakpour S, Minaee M, Fazelpour S, Zarrabian S. Effects of *Citrus aurantium* extract on spermatogenic cell density, antioxidant activity and testosterone level in male mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012; 6(7): 480-6.
4. Abd-Elraheim A El, Muhammad Mahmud AS, Samar AM. The hepato-ameliorating effect of *Solanum nigrum* against CCl₄ induced liver toxicity in Albino rats. *Egypt Acad Journal Biolog Sci* 2013; 5(1): 59-66.
5. Gangarapu V, Gujjala S, Korivi R, Pala I. Combined effect of curcumin and vitamin E against CCl₄ induced liver injury in rats. *American Journal of Life Sciences* 2013; 1(3): 117-24.
6. Abdel-Kader M, El-Sayed E, Kassem S, Shams El- Din M, Haggag M, El-Hawary Z. Protective and antioxidant effects of *cynarascolum* leaves against carbontetrachloride toxicity in rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences Journal* 2014; 5(5): 1373-80.
7. Vinod Prabhu V, Guruvayoorappan C. Phytochemical screening of methanolic extract of mangrove *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Pelagia Research Library, Der Pharmacia Sinica* 2012; 3(1): 64-70.
8. Afzal M, Mehdi FS, Abbasi Fida M, Ahmad H, Masood R, Alam J, et al. Efficacy of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. leaves extracts against some atmospheric fungi. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10(52): 10790-10794.
9. Taherzadeh M, Zandi K, Yaghoobi R, Tajbakhsh S, Rastian Z. Antiviral activity of *avicennia marina* (Forssk) Vierh. on poliovirus in cell culture. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2008; 24(1): 38-46.
10. Jain R, Monthkantirat O, Tengamnuay P, De-Eknamkul W, Avicenninone C. Isolated from *Avicennia marina* exhibits 5a-reductase-type 1 inhibitory activity using an androgenic alopecia relevant cell-based assay system. *Molecules* 2014; 19: 6809-6821.
11. Pakia Lincy M, Paulpriya K, Mohan VR. In vitro antioxidant activity of *Avicennia marina* (Forssk) vierh pneumatophore (Avicenniaceae). *Science Research Reprinter Journal* 2013; 3(2): 106-14.
12. Fathi Moghaddam H, Mokhtari M, Kamaei L, Ahangarpour A. Effects of *Avicennia Marina* leaves aqueous and hydro alcoholic extract on streptozotocin-induced diabetic male rats. *Rafsanjan University of Medical Sciences Journal* 2011; 10(4): 245-54.
13. Zamani Gandomani M, Forouzandeh Malati E. Antinociceptive effect of extract of mangrove (*avicennia marina*) in male rats. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services* 2014; 36(1): 34-9.
14. Abdolahnejad A, Gol A, Dabiri S, Javadi A. Preventive and therapeutic role of garlic on the epididymis and seminal vesicle of male diabetic rats. *Hormozgan University of Medical Sciences Journal* 2010; 14(10): 98-108.
15. Kerishchi Khiabani P, Nasri S. The effect of apiumgraveolens hydroalcoholic seed extract on sperm parameters and serum testosterone concentration in mice. *armaghane-danesh. Yasuj University of Medical Sciences Journal* 2014; 19(7): 592-601.
16. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Ghanbari Z, Ghanbari M, et al. Anti-oxidative effect of Citro flavonoids on spermatogenesis in rat. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; 5(6): 721-5.
17. Johnson L, Donald L, Thompson JR, Dickson D. Role of sertoli cell number and function regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science Journal* 2008; 105: 23-51.
18. Hinneburg I, Damien Dorman HJ, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem Journal* 2006; 97: 122-9.
19. Chu Y, Sun J, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. *Agric Food Chem Journal* 2002; 50: 6910-16.

The Effect of *Avicennia Marina* hydroethanolic Leaf Extract on Testes Tissue and Spermatogenesis in Male Rats Induced with Carbon Tetrachloride

Soleimani Z, Mirazi N*

Biology Department, Faculty of Basic Sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: 6 Jul 2015

Accepted: 15 Sep 2015

Abstract

Background & aim: Poisoning with carbon tetrachloride produces free radicals in the body tissues including testicles. Medicinal plants have been used in traditional medicine for its treatment. In the present study, the protective effect of *Avicennia marina* leaves extract on spermatogenesis in male rats induced with carbon tetrachloride was investigated.

Methods: In the present experimental study, 42 male rats were divided into six groups including control group (receiving saline normal), sham (receiving olive oil), group induced CCl_4 (receiving 2ml/kg carbon tetrachloride with 1:1 with olive oil, single dose, i.p), and treated groups 1, 2, and 3 (receiving 2ml/kg carbon tetrachloride with 1:1 with olive oil, single dose and the extract with daily dosages of 200, 400 and 800mg/kg, i.p). Two hours after injecting carbon tetrachloride, the extract was injected peritoneally for 4 days. Then, the testes weight, sperm count, sperm count and motility was assessed. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's test.

Results: This study revealed that the number and mobility of the sperms in the group induced by CCl_4 showed a significant reduction ($P < 0.001$). The study also showed that carbon tetrachloride causes necrosis of the testis tubules ($P < 0.001$). The GSI index in treated groups compared to carbon tetrachloride receiving group increased significantly ($P < 0.001$).

Conclusions: *Avicennia marina* leaves extract contains anti-oxidants and has a protective effect against carbon tetrachloride toxic effects.

Key words: *Avicennia marina*, Spermatogenesis, Carbon tetrachloride, Rat

Corresponding author: Mirazi N, Department of Biology, Faculty of basic sciences, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Email: mirazi205@gmail.com

Please cite this article as follows:

Soleimani Z, Mirazi N. The Effect of *Avicennia Marina* hydroethanolic Leaf Extract on Testes Tissue and Spermatogenesis in Male Rats Induced with Carbon Tetrachloride. *Armaghane-danesh* 2015; 20 (8): 677-688.