

Protective Effect of Vitamin D on Spermatogenesis in Male Rats Treated with Lead Nitrate

Shafiee Sh¹, Mahmoodi M^{1*}, Shahidi S²

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Hamadan Branch Islamic Azad University, Hamadan Iran.

2. Neurophysiology Research Center, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +989183138358, Fax: +9808134494026, E-mail: minoomahmoodi@yahoo.com

Received: Jun 20, 2017 Accepted: Nov 21, 2017

ABSTRACT

Background & objectives: exposure to lead has a wide range side effects on fertility. Vitamin D is one of the most important vitamins required for the body. This study was conducted to determine the effect of vitamin D on spermatogenesis in male rats treated with lead nitrate.

Methods: In this experimental study, 25 adult male Wistar rats (250-300 gr) were randomly divided into 5 groups (n=5). Control group without any treatment, the group receiving lead by gavage and experimental groups receiving lead plus vitamin D at doses of 25, 50 and 75 mg/kg body weight by gavage for 28 days. At the end of the study, after anesthetizing the rats, blood samples were collected directly from heart and serum levels of testosterone hormone, Follicle-stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) were measured. Histological studies were performed to count the spermatocyte and examine the diameter of the seminal tube. Data were analyzed by SPSS software using one-way ANOVA, at significance level of $p < 0.05$.

Results: Compared to the control group, the mean serum testosterone level in the lead group significantly decreased ($p < 0.001$) and the mean LH and FSH serum levels significantly increased ($p < 0.001$). Also, spermatocytes and seminiferous tubule diameter significantly decreased ($p < 0.001$). Vitamin D consumption reduced the effects of lead intake, and this effectiveness was completely dose-dependent.

Conclusion: Our data showed that vitamin D has a significant effect on serum testosterone levels and gonadotropins.

Keywords: Vitamin D; Lead; Spermatogenesis; Rat.

تأثیر محافظتی ویتامین D بر فرآیند اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی نر تیمار شده با نیترات سرب

شیما شفیعی^۱، مینو محمودی^{۱*}، سیامک شهیدی^۲

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

۲. مرکز تحقیقات فیزیولوژی اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۸۳۱۳۸۳۵۸. فکس: ۰۸۱ ۳۴۴۹۴۰۲۶. ایمیل: minoomahmoodi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: عوارض قرار گرفتن در معرض سرب بر روی تولید مثل بسیار گسترده است. ویتامین D از مهمترین ویتامین‌های مورد نیاز بدن است. این مطالعه به منظور تعیین اثر ویتامین D بر فرآیند اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی نر تیمار شده با نیترات سرب انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۲۵ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰۰ - ۲۵۰ گرم و به صورت تصادفی به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل بدون هیچ تیماری، گروه دریافت کننده سرب به صورت گاوژ، و گروه‌های تجربی دریافت کننده سرب + ویتامین D در دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوژ. مدت زمان انجام آزمایش ۲۸ روز بود. در پایان مطالعه پس از بی‌هوش کردن موش‌ها خون‌گیری مستقیم از قلب جهت اندازه‌گیری سطح سرمی هورمون‌های تستوسترون، FSH و LH انجام و مطالعات بافت‌شناسی جهت شمارش اسپرماتوسیت و بررسی قطر لوله سمینیفر صورت گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و روش آماری ANOVA با سطح معناداری $p < 0.05$ بررسی شد.

یافته‌ها: میانگین سطح سرمی هورمون تستوسترون در گروه دریافت کننده سرب کاهش معنادار ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل و میانگین سطح سرمی هورمون‌های FSH و LH افزایش معنادار ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل نشان داد. تعداد اسپرماتوسیت و قطر لوله سمینیفر نیز دارای کاهش معنادار ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل بود. مصرف ویتامین D باعث تخفیف آثار ناشی از مصرف سرب شد. اثربخشی کاملا وابسته به دوز بود.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ویتامین D قادر است روی سطح سرمی تستوسترون و گنادوتروپین‌ها اثر معنی‌داری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ویتامین D، سرب، اسپرماتوژنز، موش صحرایی

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۸/۳۰

دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۳۰

مقدمه

پیشرفت‌های اخیر در زمینه‌های صنعت و بیوتکنولوژی منجر به تولید محصولاتی شده است که سبب بهبود شرایط انسان گردیده است ولی در کنار پیشرفت‌ها، شمار زیادی از عوامل فیزیکی و شیمیایی و بیولوژیکی ایجاد شده که محیط زیست اطراف ما را تحت تأثیر

قرار داده است [۱]. با توجه به حساس بودن تولیدمثل، این عوامل سبب بروز آسیب‌های متعددی به سیستم باروری در مرد و زن بصورت ناباروری و کم باروری گردیده است. ناباروری و کم باروری درجه‌های گوناگونی از ناهنجاری‌های تولید مثل نسبت به کارکرد طبیعی تولید مثل است. ناباروری بر

۱۵ درصد زوج‌های دنیا اثر گذاشته است و ۴۰ تا ۵۰ درصد ناباروری‌های زوجین به علت فاکتورهای مردانه است [۲]. وجود اسپرماتوزوئیدهای طبیعی و با میزان مناسب در منی برای باروری بسیار ضروری است. کم باروری در جنس نر می‌تواند ناشی از عدم توانایی در تولید اسپرم و انزال، انزال پیش‌رس، کاهش میل جنسی و عدم توانایی یا بی‌میلی برای جفت‌گیری باشد [۳]. استفاده از سرب به عنوان یک عنصر طبیعی تقریباً به آغاز تمدن بشر برمی‌گردد. از سرب در باتری‌ها، روکش کابل، سرامیک، خطوط لوله، گازوئیل و غیره استفاده می‌شود. سرب فلز طبیعی است که در آب و خاک وجود دارد و از راه دستگاه گوارش یا تنفس وارد بدن می‌شود [۴]. سرب اثرات مختلفی بر خونسازی، سیستم عصبی، کلیه، تولید مثل و استخوان دارد. علائم مسمومیت سرب شامل علائم گوارشی، کولیک، کاهش وزن، ضعف، کم خونی، آسیب به مغز، کاهش حافظه و قدرت یادگیری، ناباروری مرد و آسیب و نقص اسپرم، سقط جنین و نارسایی نوزاد می‌باشد [۴،۲]. تا کنون تحقیقات فراوانی در زمینه تاثیر سرب بر اندام‌های مختلف بدن صورت گرفته است. انجم و همکاران به آب موش‌های صحرایی به مدت ۴۵ روز استات سرب افزودند و مشاهده کردند که وزن اندام‌های تناسلی، تعداد، حرکت و زنده مانی اسپرم‌ها در گروه سرب کاهش یافت [۵]. امامی و همکاران گزارش دادند که در هفته اول پس از تزریق سرب به موش‌های گروه آزمایش میزان تحرک به کمترین مقدار خود یعنی حدود ۳۸ درصد رسیده است. در حالی که در گروه کنترل این میزان ۵۹ درصد بود. نتایج آنها نشان داد که میزان تحرک اسپرم‌ها از هفته اول به بعد رو به افزایش می‌گذارد. به طوری که در هفته سوم بین دو گروه کنترل و آزمایش اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این نتایج نشانگر آن هستند که سرب سبب کاهش میزان تحرک اسپرم‌ها می‌شود ولی این کاهش همیشگی نبوده و قابل بازگشت است. بدین ترتیب میزان

تحرک اسپرم‌ها پس از سه هفته به میزان طبیعی خود باز می‌گردد و اثرات منفی سرب بر تحرک اسپرم‌ها مرتفع می‌شود [۶]. بررسی نتایج امامی و ایرانی‌پور در مورد درصد زنده ماندن اسپرم‌ها نشان می‌دهد که در هفته دوم پس از تزریق سرب به موش‌های گروه آزمایش در صد زنده ماندن اسپرم‌ها به کمترین میزان خود یعنی حدود ۴۲ درصد می‌رسد در حالی که این میزان در گروه کنترل برابر ۷۱ درصد است. بررسی همین پارامتر در هفته سوم تفاوت معنی‌داری را بین دو گروه کنترل و آزمایش نشان نمی‌دهد. بدین ترتیب ظاهراً اثرات تزریق سرب بر این فاکتور کمی دیرتر از میزان تحرک به حداکثر خود می‌رسد ولی سریعاً در طی هفته بعدی به میزان طبیعی خود باز می‌گردد [۶].

ویتامین D یا کلسی‌فرول یکی از ویتامین‌های لازم برای بدن و از ویتامین‌های محلول در چربی است، که به رشد و استحکام استخوان‌ها از طریق کنترل تعادل کلسیم و فسفر کمک می‌کند [۷]. این ویتامین با ایجاد افزایش جذب فسفر و کلسیم از روده‌ها و کاهش دفع از کلیه به متابولیسم استخوان‌ها کمک می‌کند و همچنین از طریق ترجمه ژن‌های هسته سلول به رشد سلول کمک می‌کند. مهمترین منبع تامین این ویتامین نور خورشید می‌باشد [۸]. واژه ویتامین D به چندین شکل مختلف این ویتامین اشاره می‌نماید. دو فرم مهم برای انسان‌ها ویتامین D_2 که توسط گیاهان و ویتامین D_3 که توسط پوست بدن انسان (زمانی که در برابر آفتاب هستیم) ساخته می‌شوند، هستند [۹]. خوراکی‌ها معمولاً با ویتامین D_2 یا D_3 غنی می‌شوند. نقش اصلی ویتامین D حفظ تعادل سطح کلسیم و فسفر خون می‌باشد. ویتامین D به بدن برای جذب کلسیم، که برای شکل دادن استخوان‌ها و حفظ استحکامشان مفید است، کمک می‌کند [۱۰]. علائم کمبود ویتامین D در بسیاری اوقات مبهم و غیراختصاصی است و به همین علت در بسیاری اوقات دیر تشخیص داده می‌شود. مهم‌ترین عارضه در کودکان، بیماری راشیتیزم است

فرآیند اسپرما توژنز تحت تأثیر مسمومیت با نیترات ارائه نشده است، محققین در مطالعه حاضر بر آن شدند که به بررسی اثر ویتامین D بر فرآیند اسپرما توژنز در موش‌های صحرایی نر تحت تأثیر نیترات سرب بپردازند.

روش کار

این مطالعه تجربی، در سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه تحقیقاتی و اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان انجام پذیرفت که دارای وسایل مورد نیاز جهت خون‌گیری و سنجش‌های بیوشیمیایی بود.

تهیه محلول حاوی نیترات سرب

جهت ایجاد مسمومیت با نیترات سرب در موش‌ها از گاوآژ کردن استفاده گردید. در این روش ابتدا نیترات سرب از شرکت مرک^۳ آلمان خریداری شد. سپس مقدار ۲ میلی‌گرم آن در دو لیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده حل گردید. از این محلول روزانه با سرنگ مخصوص گاوآژ به موش‌ها خوراندند. بعد از چهار هفته موش‌های مصرف‌کننده این محلول دچار مسمومیت با نیترات سرب می‌شوند (۱۶).

ویتامین D

ویتامین D محصول شرکت داروسازی حکیم به صورت کپسول از داروخانه خریداری شد. سپس کپسول‌ها با قیچی استریل باز شده و در استوانه مدرج حاوی روغن زیتون ریخته و دوزهای مورد نظر (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن) تهیه شد. از این محلول روزانه به شکل گاوآژ به تفکیک گروه با دوزهای مشخص به حیوانات خوراندند شد (۱۵).

حیوانات

در این بررسی تجربی از ۲۵ سر موش صحرایی (رت) نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۳۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند.

که به علت کمبود ویتامین D ایجاد شده و سبب می‌شود کودکان بیمار زانوهای پرانتزی شکل و مچ دست پهن داشته باشند [۱۱]. دیر راه افتادن و کوتاهی قد کودکان یکی دیگر از علائم کمبود ویتامین D است. کمبود شدید این ویتامین می‌تواند منجر به کاهش کلسیم و متعاقب آن موجب اسپاسم عضلانی، تشنج و مشکل تنفسی نیز شود. علائم کمبود ویتامین D در بزرگسالان با درد مبهم و پراکنده در تمام بدن، ضعف کلی بدن و نیز ضعف در ایستادن و بالا رفتن از پله و در مراحل پیشرفته‌تر لنگیدن، درد استخوان بخصوص در دنده، مفصل ران، کف پا و ران می‌تواند عنوان کرد [۱۲]. یو^۱ و همکاران در مطالعه خود فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد را در روغن دانه انگور بررسی کردند و مشخص گردید روغن دانه انگور با تخریب رادیکال‌های آزاد، وزن بدن، وزن بیضه و غلظت سرمی هومون LH^۲ را افزایش می‌دهند. آنها ثابت کردند که حضور آنتی‌اکسیدان‌های قوی مانند ویتامین D باعث تخریب رادیکال‌های آزاد و بهبود عملکرد اندام تولیدمثل است [۱۳]. در مطالعه‌ای با موضوع بررسی اثر ویتامین D بر سگته مغزی، نتایج نشان داد که سطح پایین ویتامین D می‌تواند منجر به افزایش خطر ابتلا به عوارض قلبی عروقی و مرگ و میر به دنبال سگته مغزی شود. همچنین فشارخون بالا با کاهش تراکم مغز استخوان و افزایش خطر ابتلا به سگته مغزی و مرگ و میر ارتباط دارد [۱۴]. در پژوهشی تحت عنوان همراهی کمبود شدید ویتامین D با شیوع دردهای عضلانی اسکلتی با منشأ نامشخص نتایج نشان داد که کمبود ویتامین D به ویژه در درجات شدید و در زنان می‌تواند منجر به دردهای عضلانی اسکلتی بدون منشأ مشخص شود [۱۵].

از آنجایی که بر اساس جستجوی انجام شده تاکنون گزارشی در ارتباط با بررسی اثرات ویتامین D بر

¹ Yoo

² Luteinizing Hormone

³ Merk

ملاحظات اخلاقی

کلیه رفتارها با موش‌های صحرایی، مطابق با قوانین اخلاق پزشکی در مورد حیوان‌های آزمایشگاهی صورت پذیرفت.

طراحی مطالعه و گروه‌بندی

تمامی رت‌ها به مدت یک هفته جهت عادت پذیری در حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان با دسترسی آزاد به آب و غذا و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند و با دمای حدود ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت مناسب در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. حیوانات دسترسی کامل و بدون محدودیت به آب و غذای مخصوص موش (تهیه شده از شرکت خوراک دام پارس) داشتند. هنگامی که حیوانات به محدوده‌ی وزن مناسب رسیدند، آزمایشات آغاز گردید.

با توجه به مطالعات انجام گرفته [۶-۸] حیوانات به طور تصادفی در ۵ گروه ۵ تایی به صورت زیر تقسیم شدند

۱. گروه کنترل: شامل ۵ سر رت بدون هیچ نوع درمان یا تیماری؛

۲. گروه شاهد: شامل ۵ سر رت با ایجاد مسمومیت با نیترات سرب؛

۳. گروه تیمار یک: شامل ۵ سر رت، دریافت کننده نیترات سرب + درمان با ویتامین D به میزان ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن؛

۴. گروه تیمار دو: شامل ۵ سر رت، دریافت کننده نیترات سرب + درمان با ویتامین D به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن؛

۵. گروه تیمار سه: شامل ۵ سر رت، دریافت کننده نیترات سرب + درمان با ویتامین D به میزان ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن؛

نیترات سرب و ویتامین D به صورت گاوآژ در اختیار موش‌ها قرار داده شد پس از ایجاد مسمومیت درمان توسط ویتامین D با دوزهای فوق انجام شد. دوره تیمار رت‌ها ۸ هفته بود.

خون‌گیری و تهیه سرم

پس از پایان دوره تیمار، حیوانات به صورت ناشتا توسط اتر بیهوش شدند و بلافاصله خون‌گیری از قلب آنها صورت گرفت. خون بدست آمده در لوله‌های آزمایش استریل شده ریخته شد و در دستگاه سانتریفیوژ (شرکت Centurion Scientific Ltd. centrifuge 2041) بر روی زمان ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه تنظیم شد و سانتریفیوژ گردید. سرم خون بلافاصله جدا و در درون میکروتیوب‌های اپندورف ریخته شد و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از خون‌گیری از قلب، بیضه موش را از بدن حیوان خارج کرده و پس از شستن توسط سرم فیزیولوژی برای برش‌گیری و انجام کارهای پاتولوژی در فرمالین ۱۰ درصد نگهداری شد [۹].

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه نرم افزار SPSS-20 برای تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. جهت تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف استفاده شد. توزیع داده‌های مورد بررسی همه نرمال بودند. آزمون آماری مورد استفاده ANOVA یک طرفه بین آزمودنی بوده و تست توکی^۱ برای آنالیز تفاوت بین دو گروه به کار گرفته شد. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه گردید و ارزش p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری تفاوت‌های آماری در این تحقیق، در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر لوله

سمینی‌فر در گروه‌های مورد بررسی

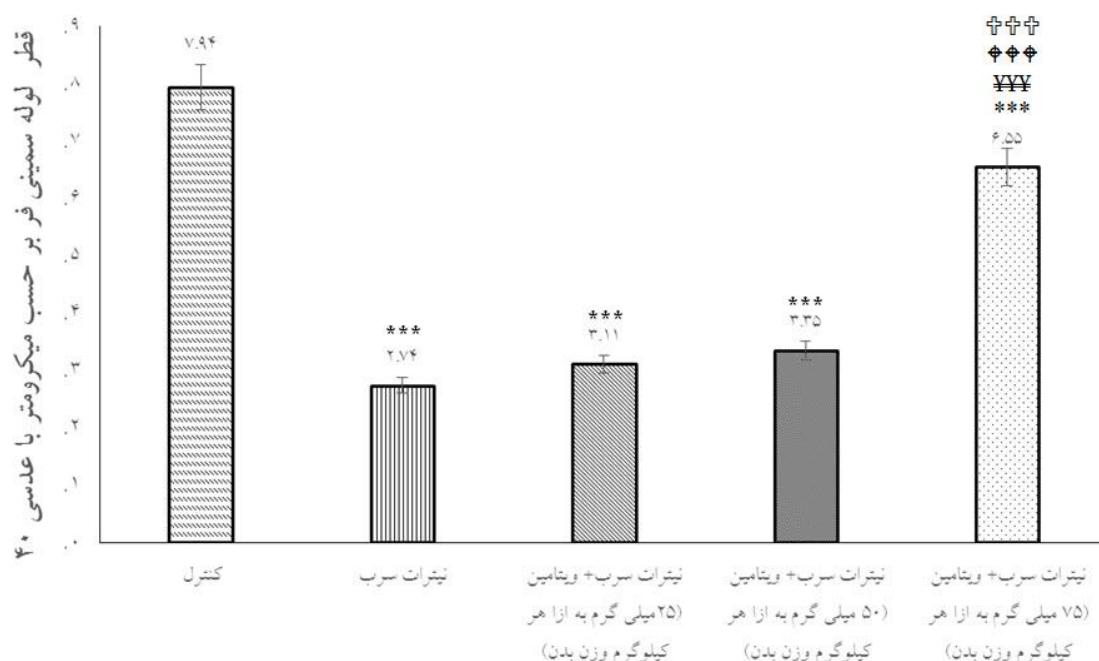
بر اساس نمودار و جدول ۱ قطر لوله سمینی‌فر در گروه موش‌های صحرایی نر تیمار شده با نیترات سرب دارای کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل است ($p < 0.001$). در گروه‌های دریافت کننده نیترات سرب + ویتامین D (۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر هر

^۱ Tukey

کیلوگرم وزن بدن) با افزایش دوز شاهد کاهش
افزایش قطر لوله سمینی فر و نزدیکی نسبی معنادار
گروه کنترل هستیم. ($p < 0.001$) قطر لوله سمینی فر به قطر این لوله در

جدول ۱. بررسی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر لوله سمینی فر در گروه‌های مورد بررسی

قطر لوله سمینی فر بر حسب میکرومتر با عدسی ۴۰	کنترل	نیترات سرب	سرب + ویتامین D (۲۵) میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)	سرب + ویتامین D (۵۰) میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)	سرب + ویتامین D (۷۵) میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)
انحراف معیار ± میانگین	۷/۹۴ ± ۰/۱۶	۲	۳/۱۱ ± ۰/۱۲	۳/۳۵ ± ۰/۱۵	۶/۵۵ ± ۰/۱۶
	< ۰/۰۰۱ ***	< ۰/۰۰۱ ***	< ۰/۰۰۱ ***	< ۰/۰۰۱ ***	< ۰/۰۰۱ ***
	< ۰/۰۰۱ ***	عدم معناداری	عدم معناداری	عدم معناداری	< ۰/۰۰۱ ***
	< ۰/۰۰۱ ***	عدم معناداری	عدم معناداری	عدم معناداری	< ۰/۰۰۱ ***
	< ۰/۰۰۱ ***	عدم معناداری	عدم معناداری	عدم معناداری	< ۰/۰۰۱ ***



نمودار ۱. بررسی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر لوله سمینی فر در گروه‌های مورد بررسی * بیان‌گر معناداری نسبت به گروه کنترل، † بیان‌گر معناداری نسبت به گروه شاهد (دریافت‌کننده نیترات سرب) ‡ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده ویتامین نیترات سرب + ویتامین D (۲۵mg/kg) ††† بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده ویتامین نیترات سرب + ویتامین D (۵۰mg/kg) (***: $P < 0.001$), (†††: $P < 0.001$), (†††: $P < 0.001$), (†††: $P < 0.001$)

بر اساس جدول و نمودار ۲، تعداد اسپرماتوسیت در گروه دریافت‌کننده نیترات سرب نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنادار ($p < 0.001$) است. در

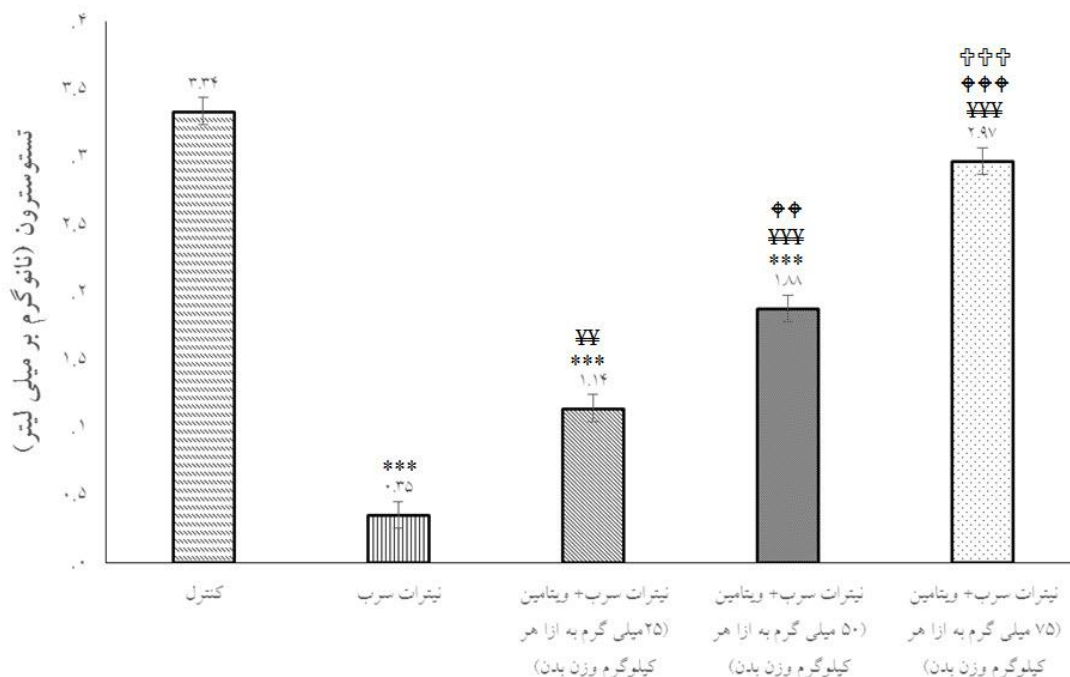
بررسی داده‌های حاصل از شمارش تعداد اسپرماتوسیت در گروه‌های مورد بررسی

میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن افزایش معناداری ($p < 0.001$) نسبت به گروه دریافت کننده نیترات سرب نشان داد.

تجربی دریافت کننده نیترات سرب نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری ($p < 0.001$) نشان داد. غلظت این هورمون در گروه‌های تجربی سه گانه دریافت کننده ویتامین D با دوزهای ۲۵ تا ۷۵

جدول ۳. بررسی داده‌های حاصل از بررسی سطح سرمی تستوسترون در گروه‌های مورد بررسی

تستوسترون (ng/ml)	کنترل	نیترات سرب	سرب + ویتامین D (۲۵)	سرب + ویتامین D (۵۰)	سرب + ویتامین D (۷۵)
انحراف معیار ± میانگین	۳/۳۴ ± ۰/۱۵	۰/۳۵ ± ۰/۰۲	۱/۱۴ ± ۰/۱۹	۱/۸۸ ± ۰/۰۹	۲/۹۷ ± ۰/۰۹
		< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	عدم معناداری
		***	***	***	
			< ۰/۰۱	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱
			YY	YYY	YYY
P				< ۰/۰۱	< ۰/۰۰۱
			◆◆◆	◆◆	◆◆◆
					< ۰/۰۰۱
					◆◆◆



نمودار ۳. بررسی داده‌های حاصل از بررسی سطح سرمی تستوسترون در گروه‌های مورد بررسی * بیانگر معناداری نسبت به گروه کنترل، † بیانگر معناداری نسبت به گروه شاهد (دریافت کننده نیترات سرب) † بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده نیترات سرب + ویتامین D

معناداری نسبت به گروه شاهد (دریافت کننده نیترات سرب) † بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده نیترات سرب + ویتامین D (۵۰ mg/kg)

(۲۵ mg/kg) † بیانگر معناداری نسبت به گروه دریافت کننده نیترات سرب + ویتامین D (۵۰ mg/kg)

(◆◆◆: P < 0.001), (YYY: P < 0.001), (YY: P < 0.01), (◆◆◆: P < 0.001), (◆◆: P < 0.01), (◆: P < 0.05), (†: P < 0.05), (††: P < 0.01), (†††: P < 0.001)

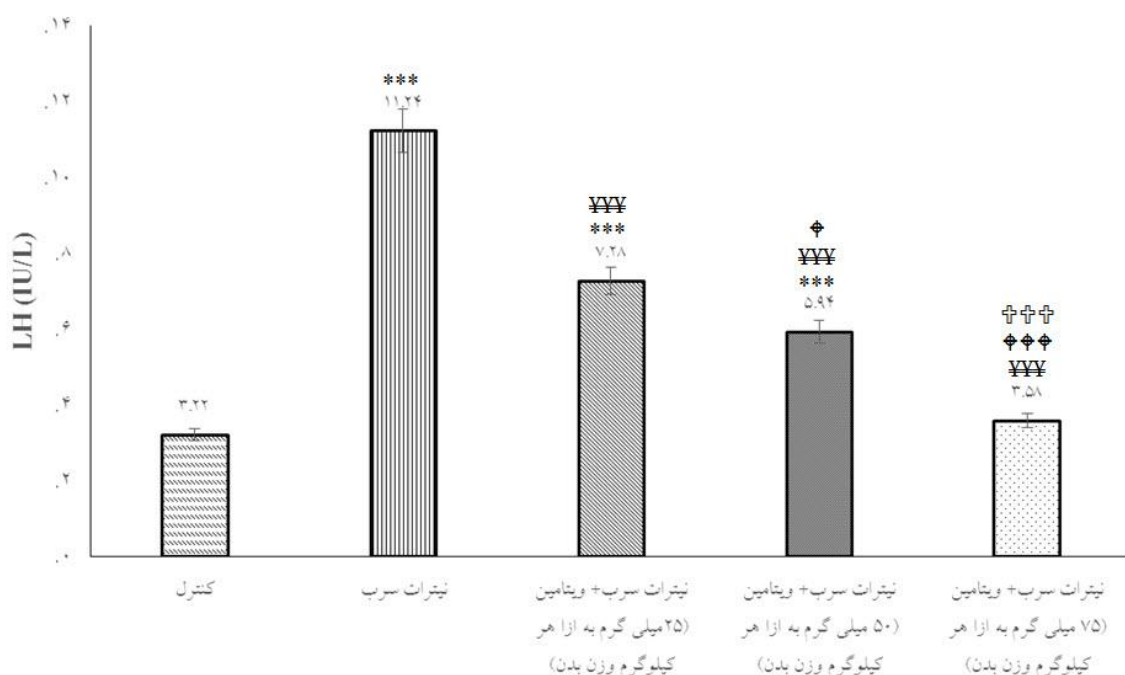
با توجه به نمودار و جدول ۳، غلظت سرمی هورمون FSH در گروه دریافت کننده نیترات سرب نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنادار

بررسی داده‌های حاصل از بررسی سطح سرمی FSH^۱ در گروه‌های مورد بررسی

^۱ Follicle-Stimulating Hormone

جدول ۵. بررسی داده‌های حاصل از بررسی سطح سرمی LH در گروه‌های مورد بررسی

سرب + ویتامین D (۷۵)	سرب + ویتامین D (۵۰)	سرب + ویتامین D (۲۵)	نیترات سرب	کنترل	LH (IU/L)
میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)	میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)	میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)			انحراف معیار ± میانگین
۳/۵۸±۰/۱۲	۵/۹۴±۰/۱۷	۷/۲۸±۰/۳۵	۱۱/۲۴±۰/۵۲	۳/۲۲±۰/۱۷	
عدم معناداری	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***	<۰/۰۰۱ ***		
<۰/۰۰۱ YYY	<۰/۰۰۱ YYY	<۰/۰۰۱ YYY			P
<۰/۰۰۱ ◆◆◆	<۰/۰۵ ◆				
<۰/۰۰۱ ◆◆◆					



نمودار ۵. بررسی داده‌های حاصل از بررسی سطح سرمی LH در گروه‌های مورد بررسی * بیان‌گر معناداری نسبت به گروه کنترل، † بیان‌گر معناداری نسبت به گروه شاهد (دریافت‌کننده نیترات سرب) ‡ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده نیترات سرب + ویتامین D (۲۵mg/kg) ◆ بیان‌گر معناداری نسبت به گروه دریافت‌کننده نیترات سرب + ویتامین D (۵۰mg/kg)

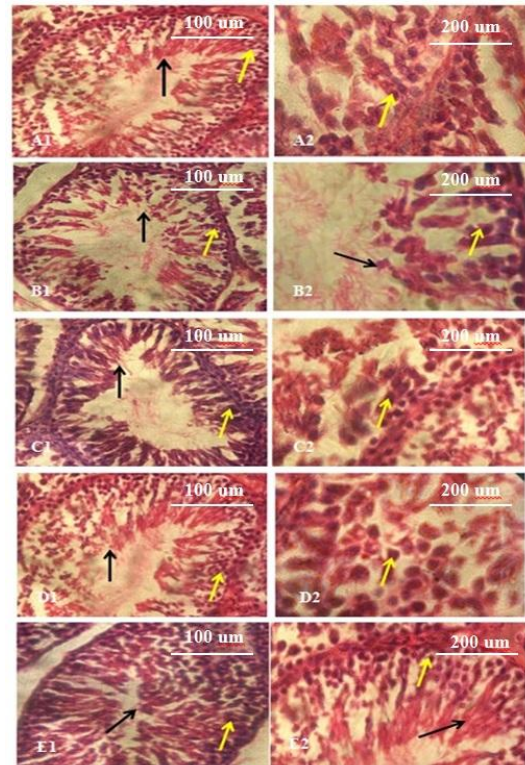
(***:P<0.001), (YYY:P<0.001) (◆◆◆:P<0.001) (◆:P<0.05) (†:P<0.001) (‡:P<0.001)

مطالعات هیستوپاتولوژی

در بررسی بافتی قطر لوله سمینی فر در گروه دریافت‌کننده نیترات سرب نسبت به گروه کنترل کاهش دارد. این در حالی است که در گروه دریافت‌کننده ویتامین در بالاترین دوز، شباهت ساختاری بافتی به گروه کنترل را بیش از دو گروه دیگر شاهد هستیم. کاهش تعداد و تراکم سلول‌ها در گروه

دریافت‌کننده نیترات سرب نسبت به گروه کنترل مشهود است. در گروه‌های دریافت‌کننده ویتامین با افزایش دوز تعداد و تراکم سلول‌ها و نیز نظم ساختاری بیش از پیش به گروه کنترل شباهت دارد.

دریافت کننده نیترات سرب نشان داد. همچنین غلظت سرمی هورمون‌های LH و FSH در گروه دریافت کننده نیترات سرب نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنادار ($p < 0.001$) بود. در گروه‌های تجربی سه گانه غلظت این دو هورمون کاهش معناداری ($p < 0.001$) نسبت به گروه دریافت کننده نیترات سرب و نزدیکی میانگین غلظت را به میانگین گروه کنترل، شاهد بودیم. نتایج بافتی نیز موید این مطلب است که در گروه دریافت کننده نیترات سرب قطر لوله سمینی فر و تعداد اسپرماتوسیت‌ها کاهش داشته و در گروه‌های دریافت کننده ویتامین با افزایش دوز پارامترهای مورد بررسی افزایش چشم‌گیری داشته و به گروه کنترل شبیه‌تر شده است. در توجیه این نتایج و با بهره‌گیری از مطالعات پیشین می‌توان چنین گفت که سرب باعث افزایش عملکرد کمپلکس آنزیمی سیتوکروم P₄₅₀ موجود در میتوکندری می‌شود و خود نیز توسط این کمپلکس تجزیه شده و ایجاد رادیکال‌های آزادی را می‌کند که این رادیکال‌ها با اتصال به اسیدهای چرب موجود در ساختار غشا اندامک‌های درون سلولی مانند لیزوزوم‌ها باعث از هم گسیختگی غشایی این اندامک‌ها و آزاد شدن مقدار بالایی از آنزیم‌های هضم کننده شده که این آنزیم‌ها با حمله به سلول موجبات آپوپتوز یا مرگ سلولی را فراهم می‌آورند. همچنین رادیکال‌های آزاد قادرند به غشا پلاسمایی سلول حمله کرده و با پراکسیداسیون لیپیدهای غشا باعث از هم گسیختگی ساختار غشا شده و مرگ سلول‌ها را موجب شوند [۱۶]. سرب با ایجاد اثر تخریبی بر سلول‌های سرتولی مستقر در لوله‌های سمینی فر و افزایش آپوپتوز این نوع سلول‌ها منجر به کاهش انتقال تستوسترون می‌شود. علاوه بر این مطالعات پیشین ثابت کرده‌اند [۱۶-۱۸] که سرب با اثر تخریبی بر سلول‌های لیدیک سبب کاهش تولید تستوسترون در سرم خون می‌شود. قرار گرفتن در معرض سرب منجر به مهار عملکرد بیضه می‌شود که این مسأله در



تصویر ۱. میکروگراف لوله منی‌ساز، سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرم‌ها با بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰

(فلش مشکی: اسپرم، فلش زرد: اسپرماتوسیت) A برش بافتی از بیضه یک موش صحرایی از گروه کنترل (B) موش صحرایی دریافت کننده نیترات سرب: C، D و E نمونه‌های بافتی تهیه شده از موش‌های صحرایی که نیترات سرب را همراه با ویتامین D با دوزهای به ترتیب ۲۵، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاوآژ دریافت کرده‌اند. با افزایش دوز بیبودی در بافت بیضه، افزایش تعداد سلول‌های جنسی و تشابه بیشتر با گروه کنترل کاملاً قابل مشاهده است.

بحث

در پژوهش انجام شده اثر محافظتی ویتامین D بر فرآیند اسپرماتوژنز در موش‌های صحرایی نر تیمار شده با نیترات سرب مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج این مطالعه غلظت سرمی هورمون تستوسترون در گروه تجربی دریافت کننده نیترات سرب نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری ($p < 0.001$) نشان داد. غلظت این هورمون در گروه‌های تجربی سه گانه دریافت کننده ویتامین D با دوزهای ۲۵ تا ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن افزایش معناداری ($p < 0.001$) نسبت به گروه

هنگام کاهش میزان تستوسترون کاملاً مشهود است. این نقص می‌تواند به علت کاهش تعداد محل‌های اتصال هورمون LH در سلول‌های لایدیگ باشد که توسط تحقیقات قبلی کاملاً اثبات شده است [۱۶، ۱۷]. کاهش تستوسترون از یک سو و کاهش تعداد محل‌های اتصال هورمون LH از سوی دیگر با اعمال بازخورد منفی در محور هیپوفیز - گناد شده و منجر به افزایش سطح سرمی هورمون LH می‌شود [۱۸] از طرفی تخریب سلول‌های سرتولی با اعمال بازخورد منفی سبب افزایش سطح هورمون FSH می‌شود و به این شکل گنادها تلاش می‌کنند با افزایش سطح هورمون‌های LH و FSH آسیب وارده توسط سرب را تعدیل کرده و مانع از ایجاد اختلال در تولید هورمون تستوسترون و روند اسپرماتوژنز شوند [۱۹]. سرب به طور مستقیم با کاهش فعالیت گیرنده‌های سلول‌های بینایی در بافت بیضه، منجر به کاهش ترشح هورمون تستوسترون می‌شود. این امر اثر بازخورد منفی تستوسترون را بر هیپوفیز کاهش داده و باعث افزایش ترشح هورمون LH از سلول‌های لوتئوتروپ در بخش قدامی هیپوفیز می‌شود [۲۰].

به طور کلی، براساس کنترل هورمونی تستوسترون، ساخت این هورمون تحت کنترل هورمون LH بوده و همچنین سطح هورمون LH نیز به مقدار هورمون تستوسترون در خون وابسته است. به طوری که با افزایش هورمون LH سطح هورمون تستوسترون افزایش می‌یابد تا توسط مکانیزم فیدبک منفی افزایش تستوسترون سطح هورمونی LH در خون را کاهش و تنظیم کند [۲۱]. ولی به سبب اثر کاهشی سرب بر تولید تستوسترون، این فیدبک منفی مختل شده و منجر به افزایش هورمون LH در خون می‌شود. هم‌زمان با افزایش LH هورمون FSH نیز افزایش می‌یابد [۱۹-۲۱]. سرب باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌شوند که این ترکیبات موجب آسیب اکسیداتیو اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و لیپید

گردیده و باعث پراکسیداسیون چربی‌های غیراشباع در غشاهای سلولی، افزایش نفوذپذیری عروق ریز و ایجاد ادم، اختلال در عملکرد میتو‌کندری و دیگر اندامک‌ها می‌شوند و لذا بالقوه سمی هستند [۲۲]. قرار گرفتن در معرض سرب منجر به مهار عملکرد بیضه می‌شود که این مساله در هنگام کاهش میزان تستوسترون کاملاً مشهود است. این نقص می‌تواند به علت کاهش تعداد محل‌های اتصال هورمون LH در سلول‌های لایدیگ باشد که توسط کمپیناس و همکاران در سال ۱۹۹۰ تایید شده بود [۲۳]. آلوچه^۱ و همکاران دریافتند وزن بیضه و هورمون تستوسترون و فضای بینابینی در لوله‌های اسپرم‌ساز در گروه مسموم شده با سرب تفاوت آشکاری با گروه کنترل نشان می‌دهد [۱]. آنتی‌اکسیدان‌های بسیار قوی مانند ویتامین D می‌تواند بافت بیضه و هورمون‌های جنسی را در مقابل مسمومیت حفظ نماید [۲۴]. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین D باعث اشغال یون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل و دور کردن آن‌ها از بافت هدف می‌شود و به این ترتیب از اکسید شدن لیپیدها و کاهش هورمون جنسی جلوگیری می‌کند [۲۵]. سوری و همکاران در تحقیقی تحت عنوان ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۲۵ دانه گیاه مورد استفاده در طب سنتی ایران، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان بر مبنای درصد مهاراکسیداسیون لینولئیک را در دانه ۲۵ گیاه بررسی کردند و متوجه شدند که ویتامین D موجود در عصاره گیاهان دارای خواص آنتی‌اکسیدانی است. در گذشته مطالعاتی پراکنده در مورد اثرات ویتامین‌ها بر فرآیند اسپرماتوژنز انجام شده است و اثرات مثبت آن در یاخته‌های زایای بیضه رت‌های دیابتی مشاهده شده است [۲۶]. یو و همکاران فعالیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد را در روغن دانه انگور بررسی کردند و مشخص گردید روغن دانه انگور با تخریب رادیکال‌های آزاد، وزن بدن، وزن بیضه و غلظت سرمی هورمون LH را

¹ Allouche

افزایش می‌دهند. آنها ثابت کردند که حضور آنتی‌اکسیدان‌های قوی مانند ویتامین D باعث تخریب رادیکال‌های آزاد و بهبود عملکرد اندام تولیدمثلی است. همچنین آنها نشان دادند که گروه هیدروکسیل (OH) ویتامین D باعث افزایش قدرت احیاکنندگی و در نتیجه افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی این ماده شده است. ویتامین D سلول‌ها را از آسیب ناشی از مواد شیمیایی و سمی محافظت می‌کند. این ماده توان آنتی‌اکسیدانی پلاسما را افزایش می‌دهد و سبب پایداری ژنومی می‌شود. همچنین با جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد مانع آسیب به ژنوم و ایجاد جهش در آن می‌شود. احتمال تأثیر ویتامین D به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی آن بر روی تعداد گیرنده‌های هورمونی LH و یا افزایش حساسیت آنها و همچنین بهبود، نگهداری و افزایش توانایی‌های سلول‌های لایدیگ می‌رود که در نتیجه آن ترشح هورمون تستوسترون افزایش یافته است [۲۶].

تحقیقات نشان می‌دهد که ویتامین D به طور غیرمستقیم (تأثیر بر گیرنده‌های تستوسترون) با افزایش ترشح تستوسترون موجب بهبود کمی و کیفی سلول‌های زایا در بیضه و همچنین اپیدیدیم شده است و هم به طور مستقیم با خنثی‌سازی استرس اکسیداتیو و بی‌اثر کردن رادیکال‌های آزاد در رشد، نگهداری، سلامت و عملکرد سلول‌های زایا به ویژه تعداد و تحرک اسپرم‌ها مؤثر بوده است [۲۷]. نتیجه پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که احتمالاً ویتامین D به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی موجب افزایش ترشح هورمون تستوسترون شده و این افزایش هورمونی خود موجب بهبود وضعیت پارامترهای سلول‌های زایا شده است. افزایش تستوسترون با ایجاد بازخورد منفی و نیز افزایش بقای سلول‌های لایدیگ از یک سو و بالا رفتن شمار گیرنده‌های LH از سویی دیگر موجبات نزدیکی میانگین سطح سرمی هورمون LH به حالت طبیعی را فراهم آورده است.

مطالعات نشان داده که آسیب سلولی ناشی از استرس‌ها و مواد شیمیایی و داروها با تولید رادیکال‌های آزاد، سبب فعال کردن واکنش آبخاری می‌گردد. این واکنش‌های آبخاری منجر به مرگ برنامه‌ریزی سلولی می‌شوند [۲۸]. ویتامین D یکی از آنتی‌اکسیدان‌های قوی و شناخته شده است [۲۹] که می‌تواند مانع از اثرات تخریبی رادیکال‌های آزاد بر روی سلول‌های بافت بیضه شود. این ویتامین به سبب وجود خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی، احتمالاً می‌تواند با افزایش پایداری و بالا بردن شانس بقا در سلول‌های آسیب دیده بافت بیضه از جمله سلول‌های سرتولی و ایجاد بازخورد منفی، باعث کاهش سطح سرمی FSH و بازگشت آن به حالت نرمال شوند.

نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج تحقیق حاضر، ویتامین D احتمالاً با مکانیسم حذف و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، سبب کاهش میزان اثرات تخریبی نیترات سرب بر بیضه و افزایش ترشح تستوسترون و به دنبال آن بازگرداندن سطح سرمی هورمون‌های LH و FSH به حالت طبیعی گردید و همچنین توانست اثرات حفاظتی قابل توجهی را از خود نشان دهد. با توجه به اثرات جانبی داروها شاید بتوان از این ویتامین به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و ایمن‌تر استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی جانوری گرایش فیزیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان است که با حمایت‌های حوزه محترم معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان به انجام رسیده است، لذا نویسندگان مقاله کمال تشکر و قدردانی را از این معاونت محترم و کلیه افرادی که در اجرای این تحقیق یاری نمودند، می‌نمایند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

- 1- Allouche L, Hamadouche M, Touabti A. Chronic effects of low lead levels on sperm quality, gonadotropins and testosterone in albino rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2009 Sep; 61(5): 503-10.
- 2- Shan G, Tang T, Zhang X. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009 Feb; 29(1): 68-72.
- 3- Graca A, Ramalho-Santos J, de Lourdes Pereira M. Effect of lead chloride on spermatogenesis and sperm parameter in mice. *Asian J Androl*. 2004 Sep; 6(3): 237-410.
- 4- Sokol RZ. The effect of duration of exposure on the expression of lead toxicity on the male reproductive axis. *J Androl*. 1990 Nov-Dec; 11(6):521-6.
- 5- Anjum MR, Sainath SB, Suneetha Y, Reddy PS. Lead acetate induced reproductive and paternal mediated developmental toxicity in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011 May; 74(4): 793-9.
- 6- Golshan- Iranpoor F, Emami E. The effects of lead on motility, viability and DNA denaturation of cauda epididymal spermatozoa of mouse. *J Shahrekord Univ Med Sci*. 2011 Oct-Nov; 13(4):1-8. [full text in Persian]
- 7- Alvarez JA, Ashraf A. Role of vitamin d in insulin secretion and insulin sensitivity for glucose homeostasis. *Int J Endocrinol*. 2010; 7(1):351-385.
- 8- Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*. 2008 Apr; 87(4):108-118.
- 9- Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol*. 2012 Sep; 2012:634195.
- 10- Nimitphong H, Chanprasertyothin S, Jongjaroenprasert W, Ongphiphadhanakul B. The association between vitamin D status and circulating adiponectin independent of adiposity in subjects with abnormal glucose tolerance. *Endocrine*. 2009 Oct; 36(2):205-10.
- 11- Patel P, Poretsky L, Liao E. Lack of effect of subtherapeutic vitamin D treatment on glycemic and lipid parameters in Type 2 diabetes: A pilot prospective randomized trial. *J diabetes*. 2010 Mar; 2(1):36-40.
- 12- Foss YJ. Vitamin D deficiency is the cause of common obesity. *Med Hypotheses*. 2009 Mar; 7(2): 314-321.
- 13- Yoo JY, Shin DH, Min BY. Composition of grape seed oil. *Korean J Food Sci Technol*. 1984; 16(3): 257-260.
- 14- Amiri A, Karimi AA, Zaheri H, Zamani L. Vitamin D deficiency and stroke. *J Fasa Univ Med Sci*. 2012; 2(3): 121-126. [full text in Persian]
- 15- Maghbooli J, Mortaza hejri S, Ebrahimpour P, Adibi H, Shafaei A, Djavadi E. Vitamin D deficiency in people with musculoskeletal pain of unknown origin. *J Reprod Infertil*. 2005 Jan-Mar; 6(1): 53-61.
- 16- Dwivedi SK, Dey S, Swarup D. Lead in blood and milk from urban Indian cattle and buffalo. *Vet Human Toxicol*. 1995 Oct; 37(5):471-2.
- 17- mokhtari M, Jelve S. Effect of Grape seed oil (*Vitis vinifera*) on serum gonadotropins and testosterone levels in adult rats exposed to lead acetate. *J Gorgan Univ Med Sci*. 2015 Spring; 17(1): 36-41. [full text in Persian]
- 18- Nassiri M, Khaki A, Bazi P, Khaki A, Sahizadeh R, Sahizadeh A. Ultra-structure study of lead acetate cytotoxic effects on testis in rabbit. *armaghane danesh*. 2008 Spring; 13(1): 45-53. [full text in Persian]
- 19- Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation-a summary of long-term research. *Sci Total Environ*. 2003 Feb; 303(1-2):79-104.

- 20- Henkel R. The impact of oxidants on sperm functions. *Andrologia*. 2005 Dec; 37(6):205-6.
- 21- Tapisso JT, Marques CC, da Luz Mathias M, da Graça Ramalhinho M. Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutat Res*. 2009 Aug; 678(1):59-64.
- 22- Murthy RC, Gupta SK, Saxena DK. Nuclear alterations during acrosomal cap formation in spermatids of lead-treated rats. *Reprod Toxicol*. 1995 Sep; 9(5): 483-9.
- 23- Goyer RA. Lead toxicity: from overt to subclinical to subtle health effects. *Environ Health Perspect*. 1990 Jun; 86:177-81.
- 24- Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by $1\alpha, 25$ dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun ; 98(12): 6800–6805.
- 25- Gedik O, Akahn S. Effects of vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia*. 1986 Mar; 29(3):142-5.
- 26- Sourì E, Farsam H, Hasani M, Azimi kheirabadi Z. Evaluation of antioxidant activity of 25 plant seeds used in Iranian folk medicine. *JMP*. 2003 Dec; 4(8):27-34.
- 27- Naziroğlu M. Enhanced testicular antioxidant capacity in streptozotocin-induced diabetic rats: protective role of vitamins C and E and selenium. *Biol Trace Elem Res*. 2003 Jul;94(1):61-72.
- 28- Baghy Nia N, Oryan SH, Fani A, Maleky Rad A. The effect of Cardamom- tea watery extract on oxidative stress. *AMUJ*. 2008 Dec; 11(4):1-7. [full text in Persian]
- 29- Reis JP, von Mühlen D, Kritz-Silverstein D, Wingard DL, Barrett-Connor E. Vitamin D, parathyroid hormone levels, and the prevalence of metabolic syndrome in community-dwelling older adults. *Diabetes Care*. 2007 Jun; 30(6):1549-55.