مقاله پژوهشی

تأثیر کوئرستین بر محور هیپوفیز-گناد، پارامترهای اسپرم و بافت بیضه در موش صحرایی نر

فاطمه زهره[1]، سیما نصری[2]، پریسا کریشچی[3]

[1] کارشناسی ارشد علوم جانوری، گروه علمی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور ،تهران، ایران

[2] دانشیار علوم جانوری، گروه علمی زیست شناسی، دانشگاه پیام نور ،تهران، ایران

[3] استادیار علوم جانوری ، گروه علمی زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس

نشانی نویسنده مسؤول: تهران، گروه علمی زیست شناسی ،دانشگاه پیام نور ، تهران٤٦٩٧-١٩٣٩٥- ایران

E-mail: s_nasri1@pnu.ac.ir

وصول:۹۳/۱۰/۲۵، اصلاح:۹۳/۱۱/۳۰، پذیرش:۹۳/۱۲/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: آنتی اکسیدان‌ها از جمله کوئرستین از آسیب سلول اسپرم توسّط رادیکال‌های آزاد محافظت می کنند. پژوهش حاضر نیز به منظور بررسی اثرات کوئرستین بر اسپرماتوژنز در موش صحرایی صورت گرفته است.

روش کار: در این مطالعه تجربی از ۵۰ سر موش صحرایی نر در قالب یک گروه کنترل و ٤ گروه تجربی استفاده شد.محلول کوئرستین ۲هفته روزانه به‌صورت داخل صفاقی در دوزهای ۵،۱۰،۱۵،۲۰ (mg/kg) به گروه‌های تجربی تزریق شد.یک هفته پس از آخرین تزریق خونگیری به منظور تعیین غلظت هورمون‌ها انجام و سپس بیضه چپ وزن کشی شد. اسپرم‌های اپیدیدیمی و برش‌های بافتی بیضه نیز مورد مطالعه قرار گرفت. داده ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه با سطح معنی داری کم‌تر از ۰/۰۵ در نرم افزار SPSS 19 بررسی شدند.

یافته ها: در این مطالعه در میزان گنادوتروپین‌های سرم خون تفاوت معنی داری مشاهده نشد. امّا، هورمون تستوسترون به ویژه در دوز ۲۰ mg/kg افزایش یافت (٦/٥٢±٠/٥٠ ، P=٠/٠٠٧٩).در تغییرات وزنی بیضه ها تفاوت معنی دار قابل قبولی دیده نشد. تعداد اسپرم‌ها در اپیدیدیم (٥١/٣٥±١/٦٨، P=٠/٠٢٥١)و تحرّک اسپرم‌ها (٧٣/٨٨±٥/٩١، P=٠/٠٠٠٢) در دوز ۲۰ mg/kg افزایش یافت.در بررسی تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی در هیچ یک از گروه ها تفاوت معنی داری دیده نشد. امّا، تعداد اسپرماتوسیت اولّیه (١١٨/٢٥±٧/٠٤، P=٠/٠١٧١)، اسپرماتید (١٠٦/٧٥±٦/٢٨، P=٠/٠٠٣٢) و اسپرماتوزوئید (١٠١/٧٥±٦/٣٠، P=٠/٠٠٠٨) هر سه در دوز ۲۰ mg/kg افزایش یافت.

بحث و نتیجه گیری: با توجّه به عدم تغییرات معنی دار گنادوتروپین‌ها احتمالا کوئرستین بر روی محور هیپوفیز-گناد مؤثّر نبوده است. گمان می رود کوئرستین با افزایش ترشح تستوسترون و اثرات آنتی اکسیدانی خود موجب بهبود کمّی و کیفی سلول های زایا شده است.

کلید واژه ها: *کوئرستین، آنتی اکسیدان، LH، FSH، تستوسترون، اسپرماتوژنز، موش صحرایی نر.*

مقدمه

تولید مثل و زاد آوری فرآیندی است که از مهم‌ترین بخش‌های زندگی هر موجود زنده به‌ویژه انسان بوده و عدم توانایی در تولید مثل همواره از عمده ترین مشکلات اجتماعی و پزشکی بوده است. در تعریف سازمان بهداشت جهانی هر گاه زن و مردی در سنّ

باروری پس از دو سال مقاربت جنسی منظم بدون استفاده از روش‌های پیشگیری یا وجود دلایلی مانند شیردهی مادر، بچه دار نشوند یکی ازآن‌هادچار ناباروری است(۱). میانگین ناباروری در هر جامعه ای تقریباً ۱۳ درصد می باشد که شایع ترین علّت ناباروری مردان عدم توانایی ایشان در تولید تعداد کافی اسپرم های سالم است(۲). امروزه با پیشرفت های پزشکی گام های فراوانی در راستای حل این مشکل مهم برداشته شده است. بررسی عوامل و شرایط مثبت در تولید تعداد کافی اسپرم های فعّال نیز در راستای همین پژوهش ها می باشد.

یکی از موادّ مهم در طبیعت و رژیم غذایی انسان آنتی اکسیدان ها می باشند. آنتی اکسیدان ها موادی هستند که از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها و رخ دادن واکنش‌های زنجیره ای اکسیداسیون جلوگیری می کنند. آنتی اکسیدان ها با برداشتن رادیکال های آزاد واسطه ای باعث پایان دادن به این زنجیره واکنش ها می شوند و از سوی دیگر با اکسید کردن خودشان سایر واکنش های اکسیداسیون را مهار می کنند. سطح پایین آنتی اکسیدان ها یا مهار آنزیم های آنتی اکسیدان باعث استرس اکسیداتیو شده که می تواند به آسیب یا مرگ سلول بیانجامد تا آن‌جا که استرس اکسیداتیو می تواند به عنوان عامل مهمی برای بسیاری از بیماری‌های انسانی تلّقی شود(۳).

از جمله دلایل ناباروری، اثر رادیکال های آزاد بر عملکرد اسپرم می باشد. استرس اکسیداتیو از دلایل اصلی ناباروری در مردان می‌باشد. وجود این مقادیر بالای رادیکال های آزاد می‌تواند به دلیل فقدان آنتی اکسیدان ها و یا رهاسازی الکترون آزاد توسّط گلبول سفید و اسپرم در حین واکنش‌های اکسیداتیو درون سلولی باشد. مطالعات نشان می دهد که بین مقدار تولید انواع اکسیژن واکنشی به وسیله اسپرم و کیفیّت اسپرم در منی ارتباط منفی وجود دارد(٤).

اسپرم حساسیّت زیادی نسبت به مقادیر بالای انواع اکسیژن فعّال(ROS) دارد. زیرا غشای پلاسمایی آن دارای مقدار زیادی اسیدهای چرب اشباع نشده است؛ در حالی‌که، سیتوپلاسم آن مقدار کمی آنزیم‌های آنتی اکسیدان را دارد(۵). در این صورت غشای پلاسمایی اسپرم آسیب دیده و فروپاشی DNA در هسته و ژنوم میتوکندری رخ می دهد (٤). آنتی اکسیدان‌ها از آسیب سلول اسپرم توسّط رادیکال‌های آزاد محافظت می کنند و کیفیّت اسپرم را بهبود می بخشند (۵). در حقیقت درمان آنتی اکسیدانی، راهی برای دفاع محافظتی در مقابل استرس اکسیداتیو و بهبود پارامترهای باروری می باشد (٦). آنتی اکسیدان های خوراکی می توانند باعث ثبات سدّ خونی- بیضه ای شوند و حفاظت DNA اسپرم را از استرس اکسیداتیو ناشی از فعّالیّت رادیکال‌های آزاد افزایش دهند وآن‌هامی‌توانند اسپرم را در طی مراحل بلوغ و مهاجرت برای ایجاد عملکردی بهتر محافظت کنند (۷). از جمله آنتی اکسیدان ها، کوئرستین می باشد که فلاونوئیدی طبیعی است. اثرات آنتی اکسیدانی قابل توجّه آن در لوله های آزمایش به اثبات رسیده است(۸). کوئرستین با فرمول شیمیایی $C_{15}H_{10}O_7$ از مهم ترین ترکیبات خانواده فلاونوئیدها بوده و دارای بیشترین خاصیّت آنتی اکسیدانی در میان آن‌هامی باشد و این ویژگی آن حتّی شش برابر قوی تر از ویتامین ث می باشد. کوئرستین در خوراکی های طبیعی مانند پیاز، انگور قرمز، مرکبات، سیب و چای دیده می شود(۹). اثرات ضدّ ویروسی، ضد باکتری و ضدّ التهابی آن در پژوهش‌هایی جداگانه به اثبات رسیده است(۱۰). همچنین در تحقیقات گوناگون اثرات درمانی آن در ارتباط با بیماری های قلبی- عروقی، سرطان، آسم و اگزما مشاهده شده است(۱۱).در گذشته مطالعاتی پراکنده در مورد اثرات کوئرستین بر فرآیند اسپرماتوژنز انجام شده است و اثرات مثبت آن در یاخته های زایای بیضه رت های دیابتی مشاهده شده است(۱۲ و ۱۳). لذا، نیاز به پژوهشی کامل در مورد

اثرات کوئرستین بر کلّ چرخه باروری موش صحرایی سالم احساس می شد.

با توجّه به نقش اساسی دو گنادوتروپین LH و FSH بر ترشح تستوسترون در محور هورمونی هیپوتالاموس- هیپوفیز- غدد جنسی که به اختصار محور HPG نامیده می شود و همچنین نقش آن‌هادر تکامل سلول‌های زایا در بیضه، به بررسی میزان تغییرات ترشح این دو گنادوتروپین نیز پرداخته شد.

با توجّه به مطالب ذکر شده، این پژوهش به منظور بررسی اثرات کوئرستین بر محور هیپوفیز-گناد، اسپرماتوژنز و بافت گنادی در موش صحرایی صورت گرفت.

روش کار

پژوهش تجربی حاضر در سال ۹۲-۱۳۹۱ در آزمایشگاه تحقیقاتی پیام نور مرکز تهران شرق انجام شد. این تحقیق بر ۵۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم (تهیه شده از انستیتوپاستور ایران) صورت گرفت. موش ها به‌صورت تصادفی در یک گروه کنترل و چهار گروه تیمار (هر گروه ۱۰ سر موش) تقسیم شدند. موش ها در اتاق حیوانات در شرایط کنترل شده (۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ^{o}C ۲۰-۲۵) و دسترسی آزاد به آب و خوراک نگهداری شدند(۱٤). در این تحقیق پروتکل های اخلاقی کار بر حیوانات آزمایشگاهی و پژوهشی رعایت شدند.

کوئرستین (خریداری شده از شرکت Sigma) به‌صورت پودر خشک با استفاده از توین ۲۰٪ در نرمال سالین کاملاً حل شد(۱۵). گروه های تحت مطالعه با توجّه به پژوهش‌های صورت گرفته در گذشته به ترتیب دوزهای 5 mg/kg، 10، 15، 20 ، کوئرستین را به مدّت دو هفته روزانه در 1ml محلول فوق به‌صورت تزریق درون صفاقی دریافت نمودند و به گروه کنترل نرمال سالین و توئین تزریق شد(۱۲ و ۱٦). یک هفته پس از پایان تزریق ها ، موش ها به‌وسیله اتر بیهوش و با باز کردن شکم، خونگیری از سیاهرگ باب کبدی آن‌ها انجام گرفت (۱۷). نمونه های خونی در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به‌مدّت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و پس از جدا کردن سرم در داخل فریزر 20c- برای سنجش غلظت سرمی هورمون های تستوسترون، LH و FSH نگهداری شدند. سنجش هورمونی با استفاده از روش تست الایزا و با استفاده از کیت‌های تولیدی شرکت کاوشیار صورت گرفت(۱۸).

پس از خونگیری حیوانات بیهوش با رعایت اصول اخلاقی کشته، بیضه چپ آن‌ها با دقّت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن کشی شدند. برای شمارش اسپرم ها نیز دم اپیدیدیم چپ حیوان را در ۵ میلی لیتر نرمال سالین خرد کرده (۱۲ و ۱٦ و ۱۹)، پس از به هم زدن به مدّت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه نمودیم. یک قطره از محلول فوق را بر روی لام نئوبار قرار داده و با شمارش اسپرم ها در مربع های ۱٦ خانه ای گلبول سفید و ضرب آن در 10^{6} تعداد کلّ اسپرم های نرمال به‌دست آورده شد. روش فوق روشی استاندارد برای شمارش اسپرم بوده و با توجّه به تعیین میزان رقیق کردن اوّلیّه و حجم مشخص مربع های لام نئوبار، عدد به‌دست آمده در یک میلیون ضرب تا تعداد اسپرم‌ها به میلیون در واحد میلی لیتر مشخص شود (۱٦). برای به‌دست آوردن درصد تحرّک اسپرم ها نیز ۱۰میکرولیتر از محلول فوق را روی لام قرار داده و اسپرم ها از لحاظ میزان تحرّک بررسی گردیدند. برای به دست آوردن درصد تحرّک، میانگین کلّ اسپرم های متحرّک در ۱۰ میدان دید میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ٤۰ به‌صورت درصد محاسبه شدند(۱۹).

بیضه های موش ها را نیز پس از وزن کشی به‌منظور تهیه لام های بافتی فیکس کرده، وارد مراحل پاساژ بافتی نموده و در نهایت برش های بافتی با ضخامت ۵ میکرومتر ازآن‌ها تهیه شده و با رنگ آمیزی

هماتوکسیلین-ائوزین لام های مورد نظر آماده شدند. سپس یاخته های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اوّلیّه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید شناسایی و تعداد آن‌هادر ده برش و در هر برش دو لوله اسپرم ساز شمارش گشت. در پایان میانگین تعدادآن‌هادر هر گروه به‌دست آمد(١٦).

با استفاده از داده های به دست آمده در سنجش ها و مطالعات فوق، نتایج بین گروه های تجربی و کنترل به صورت میانگین با احتساب انحراف معیار و سطح معنی داری ٠/٠٥ در نرم افزار SPSS 19 بررسی شد. آزمون آماری مورد استفاده در این پژوهش آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تکمیلی توکی بود. نمودارهای مربوط با استفاده از نرم افزار اکسل رسم گردیدند(١٤).

یافته ها

در سنجش هورمونی میزان غلظت LH در سرم خون موش ها، بین گروه های دریافت کننده کوئرستین با گروه کنترل تفاوت معنی داری دیده نشد؛ اگرچه، افزایش نسبی عددی آن محسوس بود. مشابه همین نتیجه در مورد میزان غلظت FSH هم بین گروه های تجربی و کنترل دیده شد. امّا، در بررسی نتایج تغییرات میزان هورمون تستوسترون بین گروه های دریافت کننده کوئرستین در مقایسه با گروه کنترل، شاهد افزایش عددی میزان هورمون می باشیم. البتّه، تنها در گروه دریافت کننده دوز ٢٠ mg/kg

جدول ١: آزمون مقایسه ای جهت بررسی میزان هورمون های LH، FSH و تستوسترون سرم خون در گروه های تجربی و کنترل (n=10)

گروه ها	میزان هورمون LH IU/L ± SEM میانگین	میزان هورمون FSH IU/L ± SEM میانگین	میزان هورمون تستوسترون IU/L ± SEM میانگین
گروه کنترل	٠/٢٣١±٠/٠٠٣	٠/١٦١±٠/٠٢	٣/٨٥±٠/٩٣
کوئرستین ٥ mg/kg	٠/٢٣٤±٠/٠٢٩	٠/٢١٥±٠/٠٣	٤/٥٨±٠/٢٣
کوئرستین ١٠ mg/kg	٠/٢٦١±٠/٠٢٣	٠/٢١٦±٠/٠٢	٤/٧٤±٠/٤٤
کوئرستین ١٥ mg/kg	٠/٢٧٣±٠/٠٣	٠/٢٢٥±٠/٠١١	٥/٣٢±٠/٢٥
کوئرستین ٢٠ mg/kg	٠/٢٩٥±٠/٠٢	٠/٢٧٥±٠/٠٣٥	**٦/٥٢±٠/٥٠

**:P<0.01 (اختلاف معنی دار با گروه کنترل)

جدول ٢: آزمون مقایسه ای جهت بررسی وزن بافت بیضه، تعداد کل و درصد تحرّک اسپرم در گروه های تجربی و کنترل(n=10)

گروه ها	وزن بافت بیضه gr ± SEM میانگین	تعداد اسپرم × ١٠٦ ± SEM میانگین	درصد تحرّک اسپرم ± SEM میانگین
گروه کنترل	١/٤٠±٠/٠١٢	٤٢/٧٠±١/٤٧	٤٥/٠٥±٤/٥٧
کوئرستین ٥ mg/kg	١/٤١±٠/٠١٦	٤٣/٦٦±١/٩٢	٤٧/٦٢±٣/٠٨
کوئرستین ١٠ mg/kg	١/٤٣±٠/٠١٤٨	٤٧/١٠±٠/٧٩	٦٠/٤٢±٢/٥٥
کوئرستین ١٥ mg/kg	١/٤٤±٠/٠١٤٦	٤٥/٠٨±١/٢٣	٥٩/٣١±١/٧٠
کوئرستین ٢٠ mg/kg	١/٤٥±٠/٠١٤٣	*٥١/٣٥±١/٦٨	***٧٣/٨٨±٥/٩١

*:P<0.05 (اختلاف معنی دار با گروه کنترل) ***:P<0.001 (اختلاف معنی دار با گروه کنترل)

جدول ٣: آزمون مقایسه ای جهت بررسی یاخته های زایای بافت بیضه در گروه های تجربی و کنترل (n=10)

گروه ها	اسپرماتوگونی ± SEM میانگین	اسپرماتوسیت اوّلیّه ± SEM میانگین	اسپرماتید ± SEM میانگین	اسپرماتوزئید ± SEM میانگین
گروه کنترل	٥٣/٠٠±٤/٧٠	٦٧/٧٥±٣/٧١	٧٤±٤/٩٦	٥٧/٧٥±٣/٤٧
کوئرستین ٥ mg/kg	٥٤/٦٦±٤/٠٩	٧٦/٥±٩/٨٢	٦٨/٥±٥/٨٠	٦٨/١٦±٤/١٧
کوئرستین ١٠ mg/kg	٦٠/٢٨±٥/٦٥	٨٩/٤٢±٩/٧١	٧٨/١٤±٣/٩٣	٧٥/٨٥±٣/٧
کوئرستین ١٥ mg/kg	٦٢/١٤±٦/٧٢	٩٠/٢٨±١٠/٦٩	٨٨/٢٨±٣/١٩	٧٣/٢٨±٦/٦٥
کوئرستین ٢٠ mg/kg	٧١/٥±٤/٩٩	*١١٨/٢٥±٧/٠٤	**١٠٦/٧٥±٦/٢٨	***١٠١/٧٥±٦/٣٠

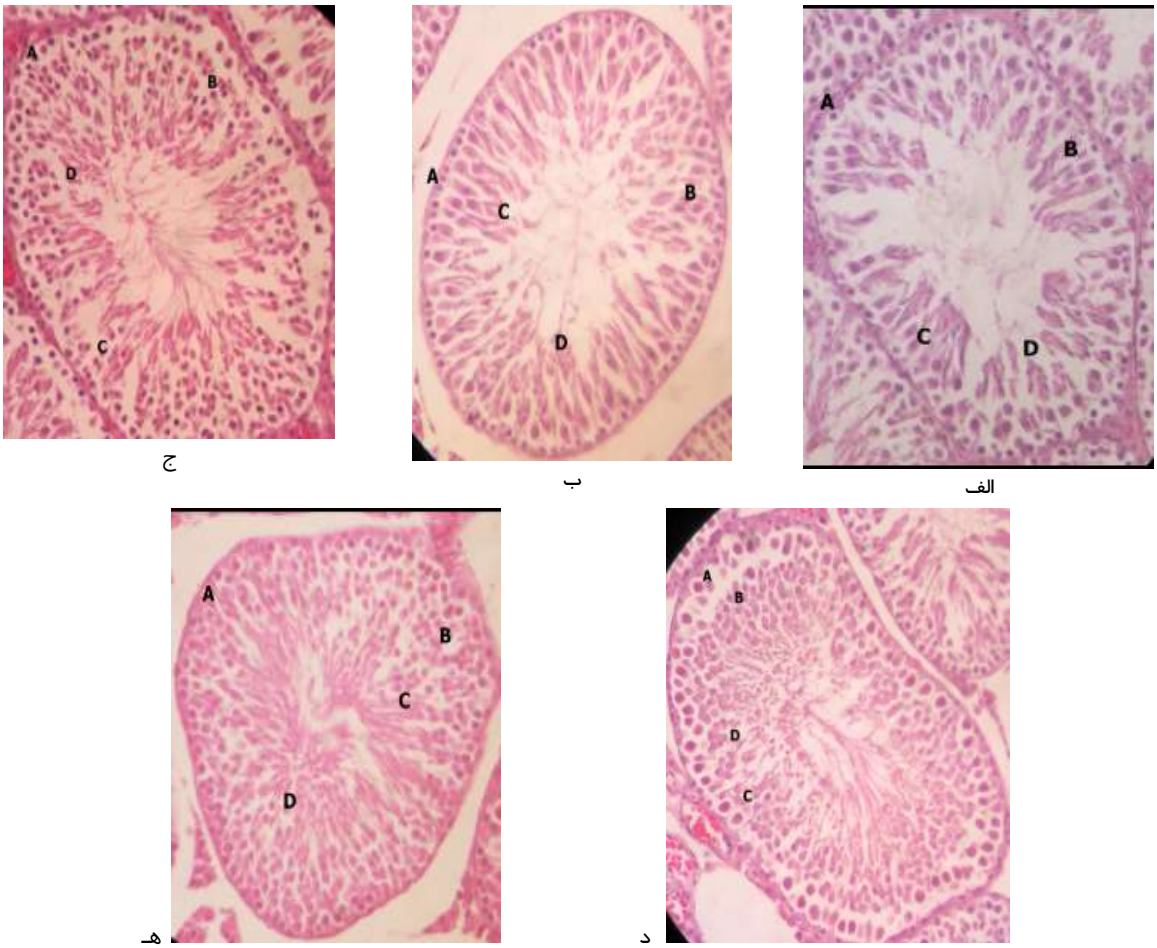
*:P<0.05 (اختلاف معنی دار با گروه کنترل) **:P<0.01 (اختلاف معنی دار با گروه کنترل) ***:P<0.001 (اختلاف معنی دار با گروه کنترل)

کوئرستین با گروه کنترل تفاوت معنی داری به میزان P=۰/۰۰۷۹ دیده می شود. در بررسی این داده ها از آزمون آماری آنوای یک‌طرفه استفاده شد(جدول ۱) .

در بررسی نتایج حاصل از اثر کوئرستین بر تغییرات وزنی بیضه ها علی رغم مشاهده شیب افزایشی محسوس در مقدار در گروه های دریافت کننده کوئرستین با دوز mg/kg ۲۰ ، تفاوت معنی داری دیده نشد. با مشاهده نتایج حاصل از اثر کوئرستین بر تعداد اسپرم های شمارش شده در اپیدیدیم بیضه چپ موش، تنها در دوز mg/kg ۲۰ شاهد افزایش معنی دار و قابل قبول به لحاظ آماری به میزان P=۰/۰۲۵۱ می باشیم. همچنین میزان تحرّک اسپرم ها با افزایش دوز تزریقی کوئرستین افزایش یافت و در دوز mg/kg ۲۰ شاهد تفاوت معنی دار به میزان P=۰/۰۰۰۲ می باشیم (جدول۲).

در بررسی آماری مقایسه تعداد سلول های اسپرماتوگونی در هیچ یک از گروه های دریافت کننده کوئرستین نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵ دیده نشد (جدول۳). امّا، در بررسی تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت در گروه های مختلف این پژوهش ضمن افزایش نسبی تعداد سلول‌ها تا دوز mg/kg ۲۰ شاهد تفاوت معنی دار به میزان P=۰/۰۱۷۱ در مقایسه با گروه کنترل می باشیم(جدول۳)(اشکال ۱-۵).

در گروه دریافت کننده کوئرستین با دوز mg/kg ۲۰ شاهد بیشترین میزان شمارش سلول های اسپرماتید می باشیم که در مقایسه با گروه کنترل دارای تفاوت معنی داری به میزان P=۰/۰۰۳۲ می باشد؛ البتّه، این روند



شکل: ۱میکروگراف بافت بیضه با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰×
الف: گروه کنترل (دریافت کننده نرمال سالین و توین)
ب: گروه تجربی ۱(دوز دریافتی کوئرستین ۵ mg/kg)
ج: گروه تجربی ۲(دوز دریافتی کوئرستین ۱۰ mg/kg)
د: گروه تجربی ۳(دوز دریافتی کوئرستین ۱۵ mg/kg)
هـ: گروه تجربی ٤(دوز دریافتی کوئرستین ۲۰ mg/kg)
A: سلول های اسپرماتوگونی
B: سلول های اسپرماتوسیت اولیه
C: سلول های اسپرماتید
D: سلول های اسپرماتوزوئید

افزایشی از دوز کم‌تر شروع شده است (جدول۳). در شمارش سلول های اسپرماتوزوئید ضمن افزایش نسبی تعداد آن‌ها همسو با افزایش دوز تزریقی تا دوز mg/kg ۲۰ ، تفاوت معنی داری نیز در این گروه در مقایسه با گروه کنترل به میزان P=۰/۰۰۰۸ دیده شد. در بررسی این داده ها از آزمون آماری آنوای یک‌طرفه استفاده شد (جدول۳) (اشکال ۱-۵).

بحث

پژوهش حاضر بر اثرات کوئرستین روی محور هورمونی هیپوفیز-گناد و اسپرماتوژنز و بافت بیضه موش های صحرایی نر انجام شد. کوئرستین به‌عنوان یکی از فراوان ترین فلاونوئید های طبیعی در گیاهان و از جمله مهم‌ترین آنتی اکسیدان ها می باشد. آنتی اکسیدان ها اثرات قابل توجّهی بر اسپرماتوژنز، کارکرد زیستی و استرس اکسیداتیو اسپرم دارند(۲۰). کوئرستین آنتی اکسیدانی فاقد هیدرات کربن می باشد.به‌همین دلیل دارای اثرات قوی تری نسبت به انواع گلیکوزید می باشد(۸). اثرات آنتی اکسیدانی قوی کوئرستین در سال ۲۰۰۹ در پژوهشی به اثبات رسیده است(۱۲). بدون شک مصرف مکمّل های ویتامینی و انواع آنتی اکسیدان ها در بهبود فاکتورهای سلامتی اسپرم و میزان ترشح هورمون های جنسی و گیرنده های آن‌ها مؤثّر می باشد. به جهت وجود همین ظرفیّت بالای آنتی اکسیدان ها در فرآورده های گیاهی، داروهای با منشا گیاهی دارای اهمیّت خاصّی در درمان ناباروری می باشند(۲۱).

در بررسی نتایج اثر کوئرستین بر روی ترشح LH متوجّه می شویم که تأثیّر چندانی بر روی ترشّح این هورمون نداشته است. همچنین بر روی ترشّح هورمون FSHکه به نحو مستقیم رشد و نگهداری اسپرم ها را موجب می شود هم تأثیّری نداشته است. با بررسی نتایج ترشّحات تستوسترون شاهد افزایش نسبی ترشّحات آن تا دوز mg/kg ۲۰ می باشیم. با توجّه به این افزایش هورمون تستوسترون و عدم افزایش چشمگیر هورمون LH که میزان ترشّح تستوسترون را در کنترل خود دارد؛ احتمال تأثیّر کوئرستین به‌علّت اثرات آنتی اکسیدانی خود بر روی تعداد گیرنده های هورمونی LH و یا افزایش حساسیّت آن‌هاو همچنین بهبود، نگهداری و افزایش توانایی های سلول های لایدیگ می رود که در نتیجه آن ترشّح هورمون تستوسترون افزایش یافته است. پژوهش ها نشان دهنده به‌وجود آمدن جهش های زیادی در گیرنده های LH واقع در سلول های لایدیگ می باشد؛ امّا، این جهش ها به‌ندرت در گیرنده های FSH در سلول های سرتولی اتّفاق می افتد(۲۲). این عدم افزایش FSH در حالی که هورمون تستوسترون افزایش پیدا کرده است را می توان به افزایش توانایی گیرنده های LH نسبت داد (۲۳).

در بررسی بافت شناسی بیضه و اسپرماتوژنز هم شاهد نتایجی مشابه نتایج به‌دست آمده در مورد هورمون تستوسترون بودیم. بیشترین اثر مثبت و قابل قبول مربوط به دوز mg/kg ۲۰ بود. همچنین در بررسی اسپرم ها همسو با افزایش دوز کوئرستین هم از لحاظ تعداد و هم از لحاظ تحرّک افزایش دیده شد. این افزایش می تواند به دنبال اثرات آنتی اکسیدانی کوئرستین باشد. از جمله عوامل کاهش و مرگ یاخته های زایا، استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدها و تغییر خاصیّت های غشایی آن‌ها می باشد که در مراحل مختلف نمو آن‌ها اختلال ایجاد کرده و حتّی موجب مرگ آن‌هامی شود. آنتی اکسیدان ها از جمله کوئرستین نقش مثبتی در از بین بردن این عوامل و اثرات آن‌ها دارند(۲٤).

در مورد یاخته های اسپرماتوسیت، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید هم دوز mg/kg ۲۰ بالاترین و بهترین نتیجه را دارا بود. در پژوهشی در سال ۲۰۰۸ اثر کوئرستین در توسعه لوله های منی ساز و افزایش یاخته هایی مانند اسپرماتوزوئید در بیضه مشاهده شد که تأیید کننده نتایج به‌دست آمده می باشد(۲۵). احتمالاً افزایش

وزن بیضه به‌ویژه در دوز mg/kg ۲۰ هم می تواند به دلیل رشد همین بخش ها باشد. آنتی اکسیدان ها لیپیدها را که از ترکیبات اساسی یاخته به‌ویژه غشا می باشند را در برابر پراکسیداسیون محافظت کرده و از استرس اکسیداتیو بیضه ای جلوگیری می کنند(۲٦). در گروهی از آزمایشات اثرات افزایشی کوئرستین بر ترشح تستوسترون دیده شده است. بارنی در پژوهشی این اثر را اثبات کرد (۲۷) و در سال ۲۰۰٤ هم این افزایش در پژوهشی دیگر مشاهده گردید (۲۸). در سال ۲۰۱۰ اثر افزایشی کوئرستین بر ترشّح تستوسترون در موش هایی که پیچ خوردگی بیضه درآن‌ها به‌وجود آمده بود، دیده شد(۲۹).

ثابت شده است که در اپیدیدیم مهارکننده رادیکال های آزادی وجود دارند که اسپرماتوزوئیدها را از آسیب اکسیداتیو حفظ می کنند(۵). این امکان وجود دارد که افزایش کیفیّت اسپرم و تعدادآن‌ها به‌ویژه در اپیدیدیم در نتیجه اثر فعّالیّت آنتی اکسیدانی کوئرستین باشد (۳۰).اثرات محافظتی کوئرستین بر سلول های اسپرماتوگونی تحت استرس اکسیداتیو هم در پژوهشی دیده شده و این محافظت و کاهش تخریب DNA سلولی از طریق دادن الکترون به ترکیبات دارای اکسیژن فعّال می باشد(۳۱). در پژوهشی دیگر نیز ثابت شد که می توان از کوئرستین به علّت داشتن اثر آنتی اکسیدانی برای نگهداری اسپرم در درجه حرارت بسیار پایین استفاده کرد (۳۲). همچنین خاکی در سال ۲۰۱۰ نشان داد که در موش های دیابتی با تیمار کوئرستین، کیفیّت و تعداد اسپرم ها افزایش می یابد (۱۲). با توجّه به این شواهد و نتایج پژوهش حاضر اثرات آنتی اکسیدانی کوئرستین در بهبود و کیفیّت اسپرم ها و سلول های زایا مشاهده می شود.

همچنین افزایش ترشّح تستوسترون تبدیل و بلوغ یاخته های زایا را از اسپرماتوگونی به اسپرم تسریع کرده است. با توجّه به این که یک دوره کامل اسپرماتوژنز در موش صحرایی نزدیک به ۳۵ روز طول می کشد و مدّت زمان تزریق کوئرستین در این پژوهش تنها ١٤ روز بوده احتمالاً می تواند دلیلی برای عدم تفاوت معنی دار تعداد یاخته های اسپرماتوگونی باشد(۳۳). ضمن آن‌که چنان‌چه گفته شد تأثیّر FSH بر روی یاخته های اسپرماتوگونی و سلول های زایای اوّلیّه و حاشیه ای لوله های اسپرم ساز بیشتر از LH می باشد که در این پژوهش میزان آن تغییر معناداری پیدا نکرد (۳٤).

در پژوهشی که بر رات های ماده اوریکتومی انجام شده، مشخص گردیده است که کوئرستین تغییری در میزان بیان LH هیپوفیز ایجاد نمی کند(۳۵). با توجّه به عدم تغییر معنی دار هورمون LH که مستقیماً ترشح تستوسترون را تحت کنترل دارد وهمچنین افزایش معنی دار هورمون تستوسترون در بالاترین دوز گروه های تجربی گمان می رود کوئرستین به‌طور غیرمستقیم (احتمالاًبا تأثیّر بر گیرنده های تستوسترون) با افزایش ترشح تستوسترون موجب بهبود کمّی و کیفی سلول های زایا در بیضه و همچنین اپیدیدیم شده است و هم بهطور مستقیم با خنثی سازی استرس اکسیداتیو و بی اثر کردن رادیکال های آزاد در رشد ، نگهداری ، سلامت و عملکرد سلول های زایا به‌ویژه تعداد و تحرّک اسپرم ها مؤثّر بوده است. نتیجه پژوهش حاضر نشان می دهد که کوئرستین احتمالاً به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی موجب افزایش ترشّح تستوسترون شده و این افزایش هورمونی خود موجب بهبود وضعیت پارامترهای سلول‌های زایا بویژه اسپرم ها شده و با اثرات حفاظتی خود در تعداد و درصد تحرّک اسپرم ها نیز مفید بوده است.به‌علّت عدم تأثیّر احتمالی کوئرستین بر محور هیپوفیز-گناد گمان می رود عوارض جانبی آن نیز کم‌تر بوده و بتوان با پژوهش های کامل تر و جامع تر در بهبود و افزایش نسبی توانایی های جنسی مورد استفاده قرار بگیرد.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی

ارشد فاطمه زهره در دانشگاه پیام نور مرکز تهران شرق می باشد. بدین وسیله از مدیریّت محترم وقت دانشگاه و همچنین همکاران و پرسنل گرامی آزمایشگاه مرکزی پیام نور تهران شرق به ویژه سرکار خانم مریم مظفری تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. World Health Organization."WHO | Infertility". World Health Organization Pub. 2013; 46-9.
2. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod. 1998; 13(6): 1532-9.
3. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. JAMA. 2007; 297 (8): 842–57.
4. Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A . The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: An overview. Asian J Androl. 2011; 13 (5): 690-7.
5. Choudhary R, Chawala VK, Soni ND, Kumar J, Vyas RK. Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. Pak J Physiol. 2010; 6(2): 54-9.
6. Bleys J, Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Appel LJ, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. Am J Clin Nutr. 2006; 84 (4): 880–7.
7. Hafez DA. Effect of Extracts of Ginger Goots and Cinnamon Bark on Fertility of Male Diabetic Rats. Journal of American Science. 2010; 6(10): 940-7.
8. Justesen U, Knuthsen P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. Food Chemistry. 2001; 73(2): 245–50.
9. Arts M, Sebastiaan Dallinga J, Voss HP, Haenen GRMM, Bast A, new approach to assess the total antioxidant capacity using the TEAC assay. Food Chem. 2004; 88(4): 567-70.
10. Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS. Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells. Biochem Pharmacol. 2006; 72(10):1268-78.
11. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. Am J Clin Nutr. 2002; 76(3):560-8.
12. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki AA, Maleki N, Jabbari Khamnei H, Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. Phytotherapy Reseach.2010;24(9): 1285–91.
13. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. Pharmacol Res. 2005; 51 (2): 117 - 23.
14. Mohebali Sh, Nasri S, Kamalinejhad M, Noori A, Antinociceptive & anti-inflammatory effects of *berberis vulgaris* l. Root's hydro alcoholic extract and determination of it's possible antinociceptive mechanism in male mice. Journal of paramedical sciences. 2011; 2(4):12-8.
15. Derakhshanian H, Marjanmehr SH, Ghadbeigi S, Rahimi N, Mostafavi SA, Hosseinzadeh P, et al. Evaluation of the protective effects of quercetin in biliary cirrhotic rats. Tehran Univ Med J. 2013; 71 (1) :1-6. [Persian]
16. Tabibian M, Nasri S, Kerishchi P, Amin G. The Effect of *Gundelia Tournefortii* Hydro-Alcoholic Extract on Sperm Motility and Testosterone Serum Concentration in Mice. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15 (8):18-21. [Persian]
17. Nasri S, Oryan S, Haeri R, Amin, Taghizadeh MA. The Effects Of *Vitex Agnus* Castus Extract And Interaction With Bromocriptine On Luteinizing Hormone And Testosterone In Male Mice. Hormozgan Med J. 2005; 9(2): 113-18. [Persian]
18. Modaresi M, Mesripour M, Asadi Margh Maleki M, Hamedanian MK. Effect Of Saffron (*Crocus Sativus*) Extract On Level Of Fsh, Lh And Testosterone In Mice. J Zanjan Univ Med Sci. 2008; 16(63):11-7. [Persian]
19. Kerishchi P, Kazem P, Rouhani A, Roostaeean A. Effect of Achillea millefolium L. extract on spermatogenesis and H-G axis in adult BALB/C mice. Yafte. 2004;6(22):13-8. [Persian]
20. Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy, Human Reproduction. 2011; 26(7): 1628-40.
21. Lodhi GM, Hameed W, Ahmed T, Latif R, Aslam M. Effects of ascorbic acid and selenium supplementation on basal testosterone cortisol ratio in male sprague dawley rats. Pak J Physiol. 2011; 7(2): 7-10.

22. Beck-Peccoz P, Romoli R, Persani L. Mutation of LH and FSH receptors. J Endocrinol Invest. 2000; 23(9): 566-72.
23. Mokhtari M, Fesharaki M, Makarian N. Effect of Sea legiline on Pituitary- Gonad Axis and Spermatogenesis in Adult Male Rats. Sci J Hamdan Univ Med Sci. 2006; 12(1): 58-62. [Persian]
24. Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamin C and E on spermatogenesis in mice exposed to Cadmium. Repro Tox. 2008; 25(1): 84-8.
25. Taepongsorat L, Tangpraprutgul P, Kitana N, Malaivijitnond S. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. Asian J Androl. 2008; 10(2): 249–58.
26. Tang XY, Zhang Q, Dai DZ, Ying HJ, Wang QJ, Dai Y. Effects of strontium fructose 1, 6-diphosphate on expression of apoptosis related genes and oxidative stress in testes of diabetic rats. Int J Urol. 2008; 15 (3): 251 - 6.
27. Barney P. DOCTOR'S GUIDE to Natural medicine. Wood land publishing, Inc., 1998; 45-9.
28. Ma Z, Nguyen TH, Huynh TH, Do PT, Huynh H. Reduction of rat prostate weight by combined quercetin–finasteride treatment is associated with cell cycle deregulation. J of Endocrinol. 2004; 181: 493–507.
29. Aktoz T, Kanter M, Aktas C. Protective effects of quercetin on testicular torsion/detorsion-induced ischaemia-reperfusion injury in rat. Andrologia. 2010; 42, 6: 376-83.
30. Moretti E, Mazzia L, Terzuolia G, Bonechi C, Acoponi IF, Martini S, et al. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. Reprod Toxicol. 2012; 34(4): 651–7.
31. Vargas AJ, Burd R. Homesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. Nutr Rev. 2010; 68(7): 418-28.
32. Henkel R. The impact of oxidants on sperm functions. Andrologia. 2005; 37(6): 205-6.
33. Ghasemi MF, Soleimani Rad J, Ghanbari AA. Morphologic and morfometric study of adult mice testes following busulfan treatment. Journal of Reproduction & Infertility. 2006; 7(1):25-36. [Persian]
34. Mahanem MN, Norazalia MA. In Vivo Effects of Centela la asiatica Leaf Extract on the Histology of Testis and Sperm Quality in Mice. Sains Malaysiana. 2004; 33(2):97-103.
35. Rachon D, Vortherms T, Seidloya-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. Dietary quercetin dose not affect pituitary lutenizing hormone(LH) expression and has no uterotropic effects in ovariectomized Sprague-Dawley rat. Food Chem Toxicol. 2008; 46(2):513-8.

The effect of Quercetin on pituitary–gonadal axis, sperm parameters and testis tissue in male rats

Fateme Zohre.,
Ms.c student of animal biology, Department of Biology, Payame noor University, Tehran, Iran

Sima Nasri.,
Associative professor of animal biology, Department of Biology, Payame noor University, Tehran, Iran

Parisa Kerishchi.,
Assistant professor of animal biology, Department of Biology, Azad University, Shahre ghods branch

Received:15/01/2015**, Revised:**19/02/2015**, Accepted:**16/03/2015

Corresponding author:
Sima Nasri,
Payame Noor University, Tehran, Iran
E-mail:s_nasri1@pnu.ac.ir

Abstract

Background and purpose: Antioxidants such as Quercetin protect sperm cells from free radical damage. This research was conducted to investigate the effects of Quercetin on spermatogenesis in male rats.

Materials and Methods: In this experimental study 50 male rats were used. Quercetin was injected daily at doses of 5, 10, 15, 20 (mg/kg) for two weeks intraperitoneally. One week after the last injection, blood samples were collected and the left testis of rats were removed and weighed. Epididymal sperm and testicular sections were also studied. Data were analyzed by using one-way ANOVA at the significant level of 0.05 in SPSS 19 software.

Results: No significant difference was found in serum level of gonadotropins, but testosterone has increased at dose of 20 mg/kg (6.52±0.50, P=0/0079).Significant difference in testicular weight wasn't seen. The number of sperm (51.35±1.68, P=0.0251) and also sperm mobility (73.88±5.91, P= 0.0002) in the epididymis especially at dose of 20 mg/kg has increased. No significant difference was found between the groups in the number of spermatogonia cells. But the number of primary spermatocytes (118.25±7.04, P=0.0171), spermatids (106.75±6.28, P=0.0032) and Spermatozoa (101.75±6.30, P= 0.0008) were increased at dose of 20 mg/kg.

Conclusion: No significant change in gonadotropins was seen, which indicates that probably Quercetin has not affected PG axis. Quercetin is believed to improve the quality and quantity of germ cells with its antioxidant effects and increasing of testosterone.

Key Words: *Quercetin, antioxidant, LH, FSH, testosterone, spermatogenesis, male rat*