مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۰، اردیبشهت ۱۴۰۰، ۱۶۲-۱۴۷

اثرات حفاظتی عصاره هیدروالکلی برگ زیتون بر پارامترهای اسپرم و کیفیت کروماتین در موش سوری در معرض حشره‌کش مانکوزب:یک مطالعه تجربی

مریم اشکنانی[۱]، حکیمه اکبری[۲]

دریافت مقاله:۹۹/۰۹/۰۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح:۹۹/۱۰/۰۶ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۰/۰۱/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۱/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: استفاده بی‌رویه از مانکوزب (Mancozeb; MZB)، منجر به صدمات دستگاه تناسلی می‌گردد. هدف مطالعه حاضر تعیین تأثیر دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی برگ زیتون (Olive leaf extract; OLE) بر آسیب تولید مثلی در موش‌های نر در معرض مانکوزب بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۶۴ سر موش نر بالغ (۱۰ تا ۱۲هفته) نژاد NMRI به‌طور تصادفی در ۸گروه (۸تایی) شامل: گروه کنترل (دریافت‌کننده نرمال سالین)، گروه دریافت‌کننده مانکوزب (۵۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم)، گروه‌های دریافت‌کننده هم‌زمان مانکوزب و OLE با دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و گروه‌های دریافت کننده OLE با دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و۴۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم تقسیم شده و به مدت ۳۵ روز یک روز در میان گاواژ شدند. سپس موش‌ها با قطع نخاع گردنی کشته شده، نمونه خون قلب جهت اندازه‌گیری سطح تستوسترون سرم جدا شد و اپیدیدیم به‌منظور بررسی اسپرم‌ها خارج شد. شاخص‌های آنالیز اسپرم (تعداد، تحرک و مورفولوژی)، میزان پروتامین و سلامت کروماتین هسته اسپرم‌ها بررسی شدند. داده‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: در گروه مانکوزب کم‌ترین میزان پروتامین (P=۰/۰۰۱) و کم‌ترین اسپرم زنده (P=۰/۰۰۵) دیده شد. در گروه‌های دریافتی OLE، میزان ناهنجاری سر (P=۰/۰۰۳) و اسپرم‌های بی‌حرکت (P<۰/۰۰۱) کاهش معنی‌داری داشت. در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم OLE، بیش‌ترین سلامت کروماتین (P<۰/۰۰۱)، بیش‌ترین حرکات سریع اسپرم (P=۰/۰۳۷) و بالاترین سطح تستوسترون (P=۰/۰۰۱) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: بیش‌ترین اثربخشی OLE در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم دیده شد. لذا احتمالاً مصرف این عصاره در همین دوز می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب حمایتی در رژیم غذایی افراد پرخطر در معرض مانکوزب لحاظ شود.

واژه‌های کلیدی: مانکوزب، اسپرم، عصاره برگ زیتون، موش سوری، ناباروری

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران
۲- (نویسنده مسئول) استادیار علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گراش، گراش، ایران
تلفن:۰۷۱-۵۲۴۴۸۱۰۱، دورنگار:۰۷۱-۵۲۴۵۲۳۳۹، پست الکترونیکی: anaakbari91@gmail.com

مقدمه

ناباروری یکی از مشکلات جوامع امروزی، خصوصاً در بین زوج‌های جوان می‌باشد. درصد بالایی از زوج‌ها به اختلالات و مشکلات ناباروری مبتلا می‌باشند. امروزه ۵۰-۳۰ درصد علت ناباروی، مربوط به جنس‌مذکر باشد [۲-۱]. برخی اختلالات ناباروری در مردان در ارتباط با پارامترهای مایع‌منی و سلول‌های اسپرم می‌باشد. اختلال در پارامترهایی مانند کاهش تعداد اسپرم، عدم تولید و بلوغ اسپرم‌های طبیعی، اختلال در حرکت اسپرم‌ها و ساختار کروماتین و هسته می‌تواند منجر به ناباروری در مردان گردد[۱]. اسپرماتوژنز فرآیندی بسیار پیچیده است که عوامل متعددی می‌تواند بر آن اثر کرده و منجر به ناباروری و یا کاهش باروری در فرد شود [۳-۲]. شواهد نشان می‌دهد که تماس با حشره‌کش‌ها می‌تواند ژن‌های والدین را تحت تأثیر قرار داده و بر روی فرزندان و نهایتاً نسل‌های بعدی تأثیر بگذارد [۴]. بیش از ۸۰ درصد از حشره‌کش‌های قابل دسترس برای مصارف کشاورزی و خانگی، دارای ترکیبات کربامات و یا ارگانوفسفات‌ها هستند که می‌توانند باعث ایجاد اختلال عملکرد اندوکرینی در موش‌های صحرایی نر شوند [۵]. دستگاه تولید مثل هر دو جنس، به دلیل تخریب مکانیزم‌های فیدبکی ناشی از اثرات منفی این حشره‌کش‌ها از جمله مانکوزب (Mancozeb) با فرمول شیمیایی *C8H12MnN4S8Zn* و نام تجاری مانکوزب دیتان‌ام (Dithane M) از گروه شیمیایی (Alkylenebis dithiocarbamate)، در طول محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- گونادال نسبت به این عوامل آسیب پذیر می‌باشند [۷-۶].

برگ زیتون (*Olea europaea* .L) به‌عنوان یک ماده خام و ارزان سرشار از ترکیبات فنولی بویژه اولئوروپین (oleuropein) می‌باشد. مطالعات متعدد آزمایشگاهی نشان‌داده است که اولئوروپین با فرمول شیمیایی C25H32O13 یکی از مهم‌ترین ترکیبات فنلی موجود در برگ و میوه زیتون می‌باشد که تلخی برگ و میوه زیتون به دلیل وجود اولئوروپین در آن است. اولئوروپین، یک استر هتروسیدیک از اسید النولیک و ۴،۳- دی هیدروکسی فنیل اتانول می‌باشد که فعالیت ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی دارد [۸]. با توجه به اثرات ضد التهابی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اولئوروپین موجود در برگ زیتون [۹]، هدف از این مطالعه تعیین اثر حفاظتی عصاره برگ زیتون بر اختلالات ناشی از مانکوزب در پارامترهای اسپرم موش سوری می‌باشد. با حصول نتایج مثبت می‌توان از عصاره برگ زیتون در رژیم های غذایی افرادی که به طور مستقیم و مداوم با مانکوزب سروکار دارند استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی، بر روی ۶۴ سر موش‌سوری نر بالغ نژاد NMRI در محدوده سنی ۱۲-۱۰ هفته در حیوان‌خانه مرکز تحقیقات دانشکده علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۹۹ انجام شد. این موش‌ها در قفس‌های تمیز خانه حیوانات با درجه حرارت ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره تاریکی- روشنایی ۱۲ ساعته و رطوبت ۴۵ درصد نگه‌داری شدند. هم‌چنین حیوانات به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمام مراحل آزمایش مطابق دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بود. در طول

آزمایشات از حیوان‌آزاری خودداری گردید. این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز و با کد اخلاق IR.IAU.SHIRAZ.REC.1399.027 می‌باشد.

مانکوزب مورد استفاده (CAS: 8018-01-7) با خلوص ۸۰ درصد بود که از کمپانی ایندوفیل هندی (Indofil chemical company, India) خریداری گردید. میزان دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن ((BW (1/10 LD50) محلول در روغن زیتون یک روز در میان گاواژ شد [۱۰]. هشت گروه مورد آزمایش که در هر گروه ۸ موش قرار داشتند، وارد مطالعه شدند. با توجه به دوره اسپرماتوژنز در موش که ۳۵ روز می‌باشد، موش‌ها به مدت ۳۵ روز در معرض حشره‌کش مانکوزب قرار گرفته و در گروه‌های درمانی عصاره برگ زیتون با دوزهای مشخص هم‌زمان تجویز گردید. تجویز در همه گروه‌ها به صورت گاواژ، در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم و به صورت یک روز در میان به مدت ۵ هفته بود. گروه کنترل به منظور شرایط یکسان با سایر گروه‌ها و حذف اثر استرس، به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم نرمال سالین دریافت کردند. گروه دریافتی مانکوزب با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن محلول در روغن زیتون (1/10 BW LD50) [۱۰] گروه‌های ۳ تا ۵ علاوه بر دریافت مانکوزب با میزان دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن محلول در روغن زیتون [۱۰] به ترتیب ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره برگ زیتون را دریافت نمودند. گروه‌های ۶ تا ۸ به ترتیب ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم عصاره برگ زیتون را دریافت نمودند [۱۲-۱۱]. برگ گیاه زیتون پایان مرداد ماه از سیف‌آباد کازرون تهیه شده و بعد از تأیید نام علمی گیاه Olea L)europaea) در گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی شیراز، یک نمونه هرباریومی از گیاه، در هرباریوم دانشکده قرار گرفت (KF 1434). به طور خلاصه جهت تهیه عصاره، مقدار ۲۰۰ گرم برگ زیتون بعد از خشک شدن، آسیاب (مدل A11 Basic Analytical mill از کمپانی IKA آلمان) و عبور دادن از الک با مش ۳۰۰ با روش ماسراسیون با اتانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. مدت عصاره‌گیری ۷۲ ساعت می‌باشد که هر ۲۴ ساعت یک مرتبه بعد از جدا کردن عصاره، حلال تازه به نمونه اضافه شد. بعد از جمع‌آوری کل عصاره به وسیله دستگاه تقطیر در خلاء (مدل RV10 Control از کمپانی IKA آلمان) تغلیظ و در دمای کم‌تر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید. عصاره خشک و توزین شده تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. با توجه به این‌که عمده ترکیبات برگ زیتون از دسته فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک می‌باشند، لذا به منظور استانداردسازی عصاره گیاهی با انجام Thin layer کروماتوگرافی و تعیین فلاونوئید غالب گیاه، در ۱۰۰۰ گرم از این عصاره برگ زیتون، محتوای کل فلاونوئید ۱/۴۳ گرم با استفاده از منحنی کالیبراسیون روتین و محتوای فنلی کل گیاه ۱/۴۴ گرم از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. به این طریق عصاره برگ‌زیتون گونه Olea europaea تهیه شد [۱۱]. پس از ۳۵ روز تیمار طبق تقسیم‌بندی گروه‌ها، موش‌های هر گروه به روش نخاعی کشته شدند. پس از جراحی و بازکردن اسکروتوم، ناحیه وازدفران چپ جدا

شده و در پتری دیشی که حاوی ۱/۵ سی‌سی نرمال سالین بود قرار داده شد و شاخص‌های ذیل مورد بررسی قرار گرفت:

بررسی تراکم اسپرم: با استفاده از لام نئوبار و بر اساس تعداد برحسب میلیون در میلی‌لیتر گزارش شد. سوسپانسیون محیط حاوی اسپرم، به نسبت ۱:۹ با فیکساتیو فرمالین ۱۰درصد رقیق شده و بعد از ۲ دقیقه و فیکس کردن اسپرم‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی اسپرم بر روی لام نئوبار قرار داده شده و یک لامل به ابعاد ۲۲×۲۲ میلی‌متر روی آن قرار گرفت. ضخامت مایعی که در زیر لامل پخش می‌شود ۲۰ میکرومتر در نظر گرفته شده و لام با بزرگنمایی ۴۰ ارزیابی شد [۱۳].

بررسی تحرک اسپرم: حرکات اسپرم بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی به ۴ نوع تقسیم شد:

A: اسپرم‌هایی با حرکت سریع و جلو رونده، B: اسپرم هایی با حرکت آهسته و جلو رونده، C: اسپرم‌هایی با حرکت غیر پیش رونده یا درجا و D: اسپرم های بی حرکت تقسیم شد [۱۴].

بررسی شکل اسپرم: یک قطره از سوسپانسیون حاوی اسپرم روی لام کشیده شده و پس از خشک شدن توسط رنگ آمیزی ائوزین Y و چسباندن لامل روی نمونه، ارزیابی اسپرم‌ها زیر میکروسکوپ نوری (Nikon TS-100, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰۰ صورت گرفت [۱۵]. بررسی درصد اسپرم‌های غیرطبیعی: جهت بررسی تغییرات شکلی اسپرم از معیار استاندارد Turk et al (2007) استفاده شد. در این روش اسپرم‌ها با رنگ آمیزی ائوزین-نیگروزین مطالعه شد. سپس اسلایدها زیر میکروسکوپ نوری (Nikon TS-100, Japan) با بزرگنمایی ۴۰۰ مشاهده شد. برای هر گروه ۳۰۰ اسپرم در هر اسلاید مطالعه گردید [۱۶]. جهت بررسی کمبود پروتامین اسپرم با رنگ آمیزی کرومومایسین (Chromomycin A3; CMA3) ابتدا مایع استخراجی از انتهای وازدفران، پس از ۳ بار شستشو با PBS (۳۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه) از اسپرم‌ها جدا شدند، سپس از اسپرم‌های شسته شده جهت رنگ آمیزی CMA3 استفاده شد. به اسپرم‌های شسته شده، حجم مساوی از محلول فیکساتیو کارنوی (متانول و اسیداستیک به نسبت ۳ به ۱) اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از تهیه اسمیر از نمونه، هر اسلاید با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۲۵ درصد از کرومومایسین در بافر مک الوین با pH=۷ به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک رنگ شده سپس اسلایدها با PBS شسته و با لامل مونت گردید. با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (Japan-Nikon-Eclipse600) و بزرگ‌نمایی ۱۰۰ تعداد ۲۰۰ اسپرم در هر اسلاید شمارش شد. اسپرم‌های درخشان، CMA3 مثبت و اسپرم‌های فاقد درخشندگی، CMA3 منفی در نظر گرفته شد [۱۷]. ارزیابی تخریب DNA به روش SCD (sperm chromatin dispersion) یا تفرق کروماتین: برطبق روش Fernandez مقدار ۳۰ میکرو لیتر از نمونه اسپرمی آماده شده به روش گرادیان خالص اسپرم (غلظت ۵ تا ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر) با ۷۰ میکرو لیتر از آگاروز با درجه ذوب پایین (low Melting Agarus) دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس نمونه مخلوط شده برروی لامی که از قبل با آگاروز ۰/۶۵ درصد پوشیده شده، قرار گرفت. با

گذاشتن یک لامل روی آن، به مدت ۴ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس با دقت لامل از سطح لام جدا شده و هر لام به صورت افقی در محلول اسید کلریدریک ۰/۰۸ نرمال به مدت ۷ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده شد و در درجه حرارت اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول تجزیه کننده اول (pH=۷/۵) با محتوی: (تریز اسیدی ۰/۴ مولار، دومرکاپتواتانول ۰/۸ مولار، اس دی اس (SDS) یک درصد، اتیلن دی امید تترا استیک اسید (EDTA) ۵۰ میلی مولار) و به دنبال آن در محلول تجزیه کننده دوم (pH=۷/۵) با محتوی: (تریز ۰/۴ مولار، کلرید سدیم ۲ مولار و اس دی اس (SDS) یک درصد) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. لام در بافر تریز بورات (pH=۷/۵) با محتوی: (تریز بورات ۰/۰۹ مولار و اتیلن دی امید تترا استیک اسید (EDTA) ۰/۰۰۲ مولار) به مدت ۲ دقیقه شستشو شده و به ترتیب در الکل ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد، هرکدام به مدت ۲ دقیقه آب‌گیری شده و بعد از خشک شدن، با محلول رنگ دیفکوئیک رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ نوری (Olympus BH-2, Japan) بررسی شد. با استفاده از این روش می‌توان میزان فراگمانتاسیون DNA را با توجه به وجود هاله اطراف هسته و اندازه آن بررسی نمود. در اسپرم‌های با فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله کوچک و بدون هاله به عنوان اسپرم تخریب شده) و هسته اسپرم بدون فراگمانتاسیون DNA (هسته اسپرم با هاله بزرگ و هاله متوسط) تعیین شد [۱۸]. جهت بررسی سطح تستوسترون حدود ۲ سی‌سی خون از قلب حیوان تهیه شده و پلاسمای آن برای آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد، سپس سطح تستوسترون با استفاده از کیت (ETE126)IBL اندازه‌گیری شد [۱۱]. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ مورد تحلیل قرار گرفت. نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش شد. به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون ناپارامتری Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و فرض نرمال بودن برقرار بود (P>۰/۰۵). همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Levene بررسی شد و فرض همگنی واریانس گروه‌ها نیز پذیرفته شد (P>۰/۰۵). میانگین گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون تعقیبی Tukey مورد مقایسه قرار گرفت. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

پارامترهای اسپرم شامل درصد اسپرم‌های زنده، انواع حرکات، ناهنجاری‌های ظاهری، کمبود پروتامین اسپرم، میزان تفرق کروماتین و میزان هورمون تستوسترون بررسی گردید. بر طبق جدول ۱، بیش‌ترین تعداد اسپرم‌های زنده در گروه دریافت‌کننده ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره برگ زیتون دیده شد و کمترین میزان آن در گروه دریافت‌کننده مانکوزب دیده شد (P=۰/۰۰۵). بر اساس جدول ۱: حرکات نوع سریع (A)، کند (B) و بی‌حرکت (D) در گروه‌های مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌دار داشت (P□۰/۰۵). کم‌ترین درصد حرکات نوع سریع و کند در گروه دریافت‌کننده مانکوزب دیده شد. بیش‌ترین حرکت نوع D و غیر پیش‌رونده (C) در گروه مانکوزب دیده شد. از طرفی، حرکت نوع C که

همان حرکات درجای اسپرم می‌باشد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (P=۰/۴۳۱) (جدول۱).

جدول ۱- اثر مانکوزب و دوزهای مختلف عصاره برگ زیتون بر درصد اسپرم‌های زنده و انواع حرکات اسپرم در موش سوری پس از ۵ هفته درمان

متغیر / گروه‌های مطالعه	اسپرم‌های زنده (درصد) انحراف معیار± میانگین	حرکت سریع (درصد) انحراف معیار± میانگین	حرکت کند (درصد) انحراف معیار± میانگین	حرکت درجا (درصد) انحراف معیار± میانگین	بی‌حرکت (درصد) انحراف معیار± میانگین
کنترل (تعداد=۸)	۴۱/۷۵ ± ۱۱/۵۳	۵۳/۱۲ ± ۱۱/۹۴	۲۰/۱۲ ± ۷/۷۹	۱۵/۲۵ ± ۹/۹۹	۱۱/۵۰ ± ۵/۰۱
مانکوزب(تعداد=۸)	۳۰/۵۰ ± ۱۰/۹۶[a]	۴۱/۳۸ ±۸/۲۲[a]	۱۱/۵۰ ± ۳/۱۶[a]	۲۲/۲۵ ± ۸/۴۱	۲۴/۸۸ ± ۶/۶۴[a]
مانکوزب+۲۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۴۴/۱۲ ± ۴/۶۱[b]	۵۳/۲۵ ± ۶/۲۰	۲۶/۰۱ ±۶/۶۱[b]	۱۳/۸۸ ± ۶/۶۰[e]	۶/۸۸ ± ۱/۲۴[b]
مانکوزب+۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۴۲/۸۰ ± ۵/ ۸۱[b]	۵۱/۰۱ ±۸/۵۸	۲۵/۱۷ ±۵/۸۳[b]	۱۳/۶۰ ± ۶/۷۹	۷/۹۰ ± ۲/۸۷[b]
مانکوزب+۴۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۳۸/۵۰ ± ۷/۱۹ [b]	۵۲/۸۸ ± ۸/۳۷	۲۴/۸۸ ±۶/۹۵[b]	۱۳/۷۵ ± ۶/۷۱	۸/۵۰ ±۳/۰۲[b]
۲۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۴۳/۸۸ ± ۸/۳۲[b]	۵۶/۸۸ ± ۹/۲۵[b]	۲۰/۵۰ ±۴/۲۰	۱۴/۱۲ ± ۱۰/۲۸	۸/۵۰ ±۲/۷۲[b]
۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۳۴/۰۲ ± ۸/۶۸[a]	۵۳/۸۰ ± ۷/۴۳	۲۲/۱۴ ± ۵/۷۸	۱۶/۱۱ ± ۸/۸۵	۸/۷۰ ±۷/۱۳[b]
۴۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۳۲/۵۰ ±۸/۱۲[a]	۴۶/۷۵ ± ۱۳/۶۹[c]	۱۸/۶۲ ±۷/۴۸[d]	۱۸/۲۵ ±۱۰/۴۹[c]	۱۶/۳۸ ±۹/۸۵[b]
مقدار p	۰/۰۰۵	۰/۰۳۷	<۰/۰۰۱	۰/۴۳۴	<۰/۰۰۱

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار. همه روش‌های تجویز خوراکی یک روز در میان و به مدت ۵ هفته بود. در هر متغیر، a تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل، b تفاوت آماری معنی‌دار با گروه مانکوزب، c تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ۲۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون، d تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون ، e تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ٤۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون.

بیش‌ترین کمبود پروتامین اسپرم، در گروه مانکوزب و کم ترین میزانش در گروه کنترل دیده شد (P=۰/۰۰۱). هرچه اسپرم میزان پروتامین کم‌تری داشته باشد کمبود پروتامین آن بیش‌تر گزارش می‌شود (جدول ۲). هم‌چنین در اسپرم-های زنده درصد ناهنجاری‌های ساختاری در اسپرم در سه ناحیه سر، گردن و دم بررسی شد که در جدول ۲ نشان داده شد. اختلالات ساختاری اسپرم (در ناحیه سر، گردن و دم) در بین گروه‌های مورد مطالعه به طور معنی‌داری با هم تفاوت داشت (P□۰/۰۵). بیش‌ترین ناهنجاری سر اسپرم، در گروه مانکوزب بود و کم‌ترین میزان آن در گروه دریافت کننده ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره برگ زیتون دیده شد (P=۰/۰۰۳). بیش‌ترین ناهنجاری گردن اسپرم، در گروه

مانکوزب دریافت کننده ۴۰۰ میلی‌گرمی عصاره برگ زیتون دیده شد و کم‌ترین میزان آن در گروه کنترل دیده شد (P=۰/۰۰۵). بیش‌ترین ناهنجاری دم اسپرم، در گروه کنترل دیده شد و کم‌ترین میزان آن در گروه مانکوزب دیده شد (P=۰/۰۰۲) (جدول ۲). میزان کمبود پروتامین و اختلالات ظاهری در ناحیه سر، گردن و دم اسپرم در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- اثر مانکوزب و دوزهای مختلف عصاره هیدروالکی برگ زیتون بر کمبود پروتامین و درصد اختلالات ساختاری اسپرم در موش سوری پس از ۵ هفته درمان

متغیر / گروه‌های مطالعه	ناهنجاری سر اسپرم(درصد) انحراف معیار ± میانگین	ناهنجاری گردن اسپرم(درصد) انحراف معیار ± میانگین	ناهنجاری دم اسپرم(درصد) انحراف معیار ± میانگین	کمبود پروتامین(درصد) انحراف معیار ± میانگین
کنترل(تعداد=۸)	۱۸/۰۱ ± ۶/۱۸	۴۵/۷۵ ± ۵/۴۹	۳۶/۲۵ ± ۸/۶۸	۲۶/۵۰ ± ۱۰/۷۸
مانکوزب(تعداد=۸)	[a]۲۴/۵۰ ± ۵/۹۰	۵۴/۱۲ ± ۷/۲۲	[a]۲۱/۳۸ ± ۷/۳۸	[a]۵۰/۸۸ ± ۱۴/۲۹
مانکوزب+۲۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	[b]۱۵/۳۸ ± ۵/۸۷	۵۴/۱۲ ± ۱۰/۸۸	[d]۳۰/۵۰ ± ۶/۹۶	[b]۲۹/۸۸ ± ۷/۷۳
مانکوزب+۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	[e]۱۷/۱۰ ± ۳/۱۷	۵۵/۲۰ ± ۶/۴۲	۲۷/۷۰ ± ۷/۱۷	[b]۲۸/۰۷ ± ۹/۴۴
مانکوزب+۴۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۱۷/۵۰ ± ۳/۷۸	[a]۵۷/۴۹ ± ۶/۳۰	[a]۲۵/۱۱ ± ۴/۹۸	[b]۲۹/۸۸ ± ۹/۷۳
۲۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون(تعداد=۸)	[a]۱۴/۸۸ ± ۴/۰۱	۵۵/۲۵ ± ۶/۹۸	۲۹/۸۸ ± ۷/۴۳	[b]۲۸/۶۲ ± ۱۰/۲۹
۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	[b]۱۵/۱۰ ± ۵/۴۲	۵۶/۱۰ ± ۸/۷۴	۲۸/۸۰ ± ۶/۸۷	[b]۲۹/۱۴ ± ۸/۲۸
۴۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون(تعداد=۸)	[a]۲۲/۶۲ ± ۴/۹۸	۴۷/۸۸ ± ۶/۹۹ [c]	۲۹/۵۰ ± ۷/۵۴	۳۶/۸۸ ± ۱۶/۶۳
مقدار p	۰/۰۰۳	۰/۰۰۵	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار. همه روش‌های تجویز خوراکی یک روز در میان و به مدت ۵ هفته بود. در هر متغیر، a تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل، b تفاوت آماری معنی‌دار با گروه مانکوزب، c تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون، d تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ۳۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون ، e تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ٤۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون.

جهت بررسی سلامت DNA هسته اسپرم، با این روش رنگ آمیزی، هاله اطراف سر اسپرم هر چه بزرگ‌تر و پر رنگ‌تر باشد نشان‌دهنده سلامت DNA هسته اسپرم می‌باشد و هر چه اندازه هاله کوچک‌تر و کم رنگ‌تر باشد نشان‌دهنده تفرق و از هم گسیختگی ساختار هسته است. میانگین تست تفرق کروماتین اسپرم و تستوسترون به تفکیک هر گروه در جدول ۳ نشان داده شده است. تست تفرق کروماتین SCD1، SCD3 و SCD4 در گروه‌های مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌دار داشت (P□۰/۰۵). کم‌ترین درصد حرکات نوع SCD1 و بیش‌ترین SCD3 در گروه دریافت‌کننده مانکوزب دیده شد. در حالی‌که بیش‌ترین درصد حرکات نوع SCD1 و کم‌ترین SCD3 در گروه دریافت کننده ۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره برگ زیتون دیده شد (جدول۳).

براساس جدول ۳، کم‌ترین میزان تستوسترون درگروه مانکوزب دیده شد و بیش‌ترین میزان آن در گروه دریافتی۲۰۰ میلی‌گرمی عصاره برگ زیتون دیده شد که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۰۱).

جدول ۳- اثر مانکوزب و دوزهای مختلف عصاره هیدروالکی برگ زیتون بر درجات تفرق کروماتین اسپرم و میزان تستوسترون در موش سوری پس از ۵ هفته درمان

متغیر / گروه‌های مطالعه	SCD1 (درصد) انحراف معیار ± میانگین	SCD2 (درصد) انحراف معیار ± میانگین	SCD3 (درصد) انحراف معیار ± میانگین	SCD4 (درصد) انحراف معیار ± میانگین	تستوسترون (نانوگرم/میلی لیتر) انحراف معیار ± میانگین
کنترل(تعداد=۸)	^{a}۴۰/۷۱ ± ۷/۶۴	۲۸/۱۲ ± ۷/۶۹	۲۱/۱۲ ± ۸/۶۱	۱۰/۰۴ ± ۳/۲۹	^{a}۲/۷۵ ± ۰/۳۳
مانکوزب(تعداد=۸)	۲۱/۵۰ ± ۶/۳۷	۲۸/۱۲ ± ۶/۴۹	۲۷/۷۵ ± ۹/۹۶	^{a}۲۲/۶۲ ± ۷/۴۶	^{a}۱/۸۳ ± ۰/۴۳
مانکوزب+۲۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	^{b}۴۰/۱۲ ± ۷/۸۲	۲۵/۶۲ ± ۸/۵۶	^{e}۱۹/۱۲ ± ۸/۹۵	۱۵/۱۲ ± ۸/۴۴	^{b}۲/۴۰ ± ۰/۴۷
مانکوزب+۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	^{b}۳۸/۷۰ ± ۶/۲۳	۲۵/۳۰ ± ۷/۸۵ ^{c}	۱۷/۲۰ ± ۶/۲۲	۱۸/۸۰ ± ۴/۹۰	^{b}۲/۳۵ ± ۰/۳۲
مانکوزب+۴۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	^{b}۳۹/۵۰ ± ۲/۳۹	۲۶/۲۵ ± ۶/۲۲	^{b}۱۳/۷۵ ± ۳/۴۱	^{d}۲۰/۵۰ ± ۵/۴۲	۲/۱۶ ± ۰/۷۴
۲۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	^{b}۴۳/۱۱ ± ۴/۳۷	۲۹/۷۵ ± ۶/۲۵	^{b}۱۳/۵۱ ± ۵/۴۲	^{b}۱۳/۶۲ ± ۳/۱۵	^{b}۲/۹۵ ± ۰/۳۸
۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	^{b}۴۱/۲۸ ± ۴/۶۵	۲۸/۸۸ ± ۶/۱۳	۱۶/۱۲ ± ۴/۶۵	^{b}۱۳/۷۲ ± ۳/۶۴	^{b}۲/۷۴ ± ۰/۴۱
۴۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون (تعداد=۸)	۳۳/۳۸ ± ۷/۱۷	۲۷/۷۵ ± ۲/۸۶	^{b}۱۴/۷۵ ± ۹/۲۲	^{a}۲۳/۳۸ ± ۵/۵۵	^{b}۲/۴۹ ± ۰/۴۹
مقدار p	<۰/۰۰۱	۰/۹۱	۰/۰۱۳	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey، P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار. همه روش‌های تجویز خوراکی یک روز در میان و به مدت ۵ هفته بود. در هر متغیر، ^{a}تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل، ^{b}تفاوت آماری معنی‌دار با گروه مانکوزب، ^{c}تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ۲۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون، ^{d} تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ۳۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون ،^{e}تفاوت آماری معنی‌دار با گروه ٤۰۰میلی‌گرم عصاره برگ زیتون.

بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، در گروه دریافتی مانکوزب، میانگین اسپرم‌های زنده وکیفیت حرکات اسپرم کاهش یافت. هم‌چنین ناهنجاری‌های ساختاری در اسپرم افزایش یافت، در حالی‌که تجویز عصاره برگ زیتون باعث افزایش قابلیت حیات، بهبود شاخصه‌های حرکتی وکاهش

ناهنجاری‌های ساختاری در اسپرم شد. تحقیقات نشان دادند کیفیت کروماتین و هم‌چنین تعداد اسپرم یکی از فاکتورهای مستقیم اثرگذار بر فرآیند باروری است. اگر بیضه‌ها موفق به تولید اسپرم‌های کافی و سالم نباشند، ناباروری با علت مردانه غیر قابل اجتناب خواهد بود [۱۹]. از بین دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و۴۰۰ میلی‌گرم از عصاره برگ زیتون، دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر بهبود پارامترهای اسپرمی مؤثرتر بود. هم‌چنین کمبود پروتامین در این دوز کم‌تر دیده شد که نشان‌دهنده سلامت کروماتین اسپرم می‌باشد [۲۰]. در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون، بیش‌ترین حرکات نوع A و کمترین ناهنجاری در ناحیه سر اسپرم دیده شد. به طورکلی در طی مراحل اسپرماتوژنز، رشته‌های کروماتین در هسته اسپرم فشرده شده و به جای هیستون‌ها در ساختار نوکلئوزومی سلول‌های سوماتیک، پروتامین‌ها که غنی از آرژنین هستند جایگزین می‌شوند. در مجموع ۸۵ درصد از هیستون‌ها به وسیله پروتامین‌ها جایگزین می‌شوند. تصور می‌شود که این تراکم و به هم فشردگی هسته اسپرم برای محافظت ژنوم اسپرم از استرس‌های خارجی نظیر اکسیداسیون یا درجه حرارت بالا مهم باشد [۲۰]. از میان گروه‌های مورد مطالعه، سلامت کروماتین هسته اسپرم، در گروه‌های دریافت‌کننده عصاره برگ زیتون بیش‌تر بود و از میان دوزهای مختلف عصاره برگ زیتون، در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم، بیش‌ترین SCD1 و SCD2 و کم‌ترین میانگین SCD3 دیده شد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان تستوسترون در دوز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون دیده شد. مطالعات دیگر محققین، نشان دادند که در نمونه‌هایی که درصد CMA3 مثبت آن‌ها بیش از ۳۰ درصد باشد، میزان لقاح پایین‌تر است [۲۱-۱۷]. نتایج این مطالعه نیز نشان داده که رابطه معنی‌داری بین کمبود پروتامین و مورفولوژی اسپرم وجود دارد، به نحوی که هر چه میزان کمبود پروتامین بیش تر باشد، ناهنجاری‌های ساختاری در سر و گردن اسپرم بیش تر می‌شود [۲۲]. گروه مانکوزب دارای کم‌ترین میزان اسپرم‌های زنده بود. هم‌چنین اختلالات ساختاری در ناحیه سر اسپرم در گروه مانکوزب بیش‌تر از دیگر گروه‌ها بود. نتایج این مطالعه نشان داد که رابطه پارامترهای مورفولوژیکی و تحرک اسپرم، با کمبود پروتامین معنی‌دار است و هرچه کمبود پروتامین کم‌تر باشد، شاخصه‌های باروری اسپرم بهتر شده و حرکات رو به جلو اسپرم بیش‌تر می‌شود که تأیید کننده مطالعات قبلی است [۲۲]. هم‌چنین حضور اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی، بیانگر این واقعیت است که اسپرماتوزوا نتوانسته است فرآیند اسپرماتوژنز را تکمیل کند، لذا عامل تأثیرگذار بر فرآیند اسپرمیوژنز علاوه بر میزان تراکم کروماتین، مورفولوژی اسپرم را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد [۲۳]. در نتیجه افزایش ناهنجاری‌های ساختاری در اسپرم، احتمالاً با کمبود پروتامین همراه است [۲۴]. در این مطالعه هم بیش‌ترین میزان کمبود پروتامین در گروه مانکوزب دیده شد که بیش‌ترین اختلالات ساختاری و تفرق کروماتین را نیز داشت. از طرفی، بیش‌ترین تعداد اسپرم‌های زنده، بیش‌ترین حرکات نوع A و کم‌ترین حرکات نوع D در گروه مانکوزب دریافت‌کننده ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون گزارش شد.

در این تحقیق بین کمبود پروتامین و حرکات نرمال اسپرم نیز رابطه معنی‌دار از نوع معکوس وجود داشت که با مطالعه Fallah و همکاران همخوانی داشت [۲۴] و عنوان نمودند با افزایش میزان کمبود پروتامین در اسپرم، حرکات طبیعی و پیش‌رونده اسپرم کاهش می‌یابد و بدین نحو باروری فرد را تحت تأثیر قرار می دهد. Ray و همکارانش عنوان کردند که اختلالات فلاژل (ناحیه دم اسپرم) پیش آگهی خوبی دارند ولی اختلالات ناحیه آکروزوم اسپرم و ناحیه گردن اسپرماتوزئید، به شدت موفقیت باروری را کاهش می دهد، لذا به وضوح نقش اختصاصی قسمت‌های مختلف اسپرم را تشریح می‌کند [۲۵]. میانگین تستوسترون در گروه مانکوزب دارای کم‌ترین میزان بود. اختلالات در میزان هورمون تستوسترون و آسیب DNA اسپرم یا ساختار کروماتین آن می‌تواند در هر مرحله از اسپرماتوژنز رخ دهد که در نهایت می‌تواند بر قابلیت باروری اسپرم اثرگذار باشد [۲۶]. آسیب DNA در اسپرماتوزوای بالغ می‌تواند به علت نقایصی در بسته‌بندی کروماتین باشد که ممکن است از شکستگی‌های آندروژنی در DNA، روند آپوپتوز قبل از انزال اسپرم‌ها و یا تولید بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن باشد که باعث صدمه به DNA اسپرم شده باشد [۲۷]. از آن‌جایی که آسیب یا شکست در DNA اسپرم وابسته به مقدار پروتامین هسته می‌باشد، هرچه اسپرم، میزان پروتامین بیش‌تری داشته باشد در مقابل شکست DNA مقاوم‌تر می‌باشد [۲۰]. در این پژوهش مصرف مانکوزب میزان کمبود پروتامین اسپرم را افزایش داد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که مانکوزب به عنوان تولید کننده رادیکال آزاد اکسیژن می‌تواند تغییراتی را در DNA ایجاد نماید که تأییدی بر مطالعات پیشین است [۲۸]. در نهایت یکی از علل مهم ناباروری در مردان، وجود رادیکال‌های آزاد در مایع سمینال می‌باشد که باعث اکسیداسیون DNA اسپرم و تغییر بازهای آلی در ساختمان هسته می‌گردد و هم‌چنین موجب کاهش قدرت حرکتی و باروری یا تخریب اسپرم می‌شود [۲۹]. لذا در این مطالعه به امتحان این فرضیه پرداختیم که آیا استفاده از عصاره برگ زیتون به عنوان یک درمان حمایتی، قادر به کاهش آسیب احتمالی مانکوزب بر روی پارامترهای اسپرم و شاخصه‌های باروری موش سوری می‌باشد یا خیر؟ و هم-چنین در چه دوزی می‌تواند بیش‌ترین اثر بخشی را داشته باشد؟ درمان‌های زیادی مبنی بر استفاده از این گیاهان انجام شده است، در مطالعه‌ای Lee و همکارانش نشان دادند که برگ زیتون در مقابله علیه نیترات‌ها با دارا بودن ترکیبات فنولی فراوان و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، برای سلامت انسان‌ها مفید و وجود آن‌ها در داروهای پزشکی می‌تواند بسیار مؤثر باشد. در حقیقت ترکیبات فنولی باعث شکستن زنجیره‌های رادیکال‌های آزاد می‌شوند [۸]. نشان داده شده که گیاه زیتون به دلیل داشتن ترکیبات فنولی می‌تواند با مهار فعالیت اکسیدها، التهاب را سرکوب کرده و در سلامت سیستم تولید مثلی مؤثر واقع شود [۱۲-۱۱]. در این مطالعه میزان فنول تام بر اساس گالیک اسید و فلاونوئید بر اساس روتین تعیین مقدار شد. مطالعات متنوعی به بررسی ترکیبات موجود در عصاره برگ زیتون و اثراتش بر سیستم تولیدمثل پرداخته اند؛ از جمله، Alirezaei و همکاران با بررسی اولئوروپین مشتق از برگ زیتون و بررسی

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون (Glutathione) و سوپراکسیددسموتاز (Superoxide dismutase) مشاهده کردند که اثرات منفی اکسیدهای ایجاد شده توسط الکل بر سیستم تولیدمثلی موش‌صحرایی نر، با اولئوروپین کاهش می‌یابد [۳۰]. هم‌چنین Moienie و همکاران نیز با مشاهده کاهش سطح هورمون‌های جنسی و سلول‌های اسپرماتوگونی در موش‌های دیابتی، پی بردند که اثرات جانبی دیابت با استفاده از برگ زیتون در دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بهبود می‌یابد [۳۱]. دوز ۲۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ زیتون، در این مطالعه بهترین حفاظت اسپرمی را ایجاد نمود در حالی‌که دوز ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم چندان پارامترهای اسپرم را بهبود نبخشید. در مطالعه Hakemi و همکاران نیز تجویز دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره برگ‌زیتون بر اثرات تجویز بوسولفان مؤثر بود، در حالی‌که دوز ۷۵۰ میلی‌گرم اثرات مخربی بر پارامترهای اسپرم داشت [۱۱]. همسو با نتایج این مطالعه، تحقیقات Heilman و همکاران نشان داد که عصاره‌های گیاهان ممکن است در دوز های بالاتر اثر تخریبی داشته باشند از جمله برگ زیتون که آن نیز در غلظت‌های بالا تأثیر مخرب دارد [۳۲]. از محدودیت‌های این مطالعه این‌که مکانیسم‌های مولکولی درگیر در روند حفاظتی عصاره برگ‌زیتون بررسی نشد لذا نیاز به مطالعات بیش‌تری دارد. هم‌چنین ارزیابی و اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره برگ زیتون و تعیین اثرات حفاظتی آن بر سمیت‌های کبدی و کلیوی ناشی از مانکوزب و یا سایر آلکیله‌کننده‌ها جهت مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج مطالعه حاضر، تیمار با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره برگ‌زیتون، اثرات مثبتی بر روند اسپرماتوژنز، پروتامین و سلامت کروماتین هسته اسپرم موش‌های در معرض مانکوزب داشت، در حالی‌که دوز ۳۰۰ و۴۰۰ میلی‌گرم این عصاره چندان بهبود مناسبی را در شاخصه‌های اختصاصی اسپرم‌ها ایجاد نکرد. لذا به نظر می‌رسد تجویز عصاره برگ زیتون با دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم احتمالاً بتواند جهت حفاظت و بهبود وضعیت اسپرماتوژنز افرادی که به ناچار در معرض مانکوزب یا سایر آلکیله‌کننده‌ها قرار می‌گیرند مؤثرتر باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز بوده، لذا از معاونت محترم پژوهشی جهت حمایت مالی پایان‌نامه و اساتید محترم گروه جهت ثبت پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

[1] Alahmar AT. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *J Hum Reprod Sci* 2019; 12(1): 4–18.

[2] Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13(1): 1-9.

[3] Rajender S, Avery K, Agarwal A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2011; 727(3): 62-71.

[4] Mathur N, Pandey G, Jain GC. Pesticides: A review of the male reproductive toxicity. *J Herbal Med Toxicol* 2010; 4(1): 1-8.

[5] Kwon D, Chung HK, Shin WS, Park YS, Kwon SC, Song JS, et al. Toxicological evaluation of dithiocarbamate fungicide mancozeb on the endocrine functions in male rats. *Mol Cell Toxicol* 2018; 14(1): 105-12.

[6] Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 59: 10-26.

[7] Mehrpour O, Karrari P, Zamani N, Tsatsakis AM, Abdollahi M. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol Lett* 2014; 230(2): 146-56.

[8] Lee OH, Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract. *Bioresour Technol* 2010; 101(10): 3751-4.

[9] Sangi SM, Bawadekji A, Alotaibi NM, Aljalaud NA. Preventive and Curative Effects of Metformin, Nigella sativa, Punica granatum and Zingiber officinale on Male Reproductive Dysfunction in Diabetic Rats. *Int J Pharm Res Allied Sci* 2019; 8(2): 48-57.

[10] Saddein E, Haghpanah T, Nematollahi-Mahani SN, Seyedi F, Ezzatabadipour M. Preventative effects of vitamin E on testicular damage and sperm parameters in the first-generation mice pups due to pre-and postnatal mancozeb exposure. *J Toxicol* 2019; 1: 1-12.

[11] Hakemi SG, Sharififar F, Haghpanah T, Babaee A, Eftekhar-Vaghefi SH. The effects of olive leaf extract on the testis, sperm quality and testicular germ cell apoptosis in male rats exposed to busulfan. *Int J Fertil Steril* 2019; 13(1): 57–65.

[12] Yaghoubi A, Shahedi A, Akbari H, Nematollahi-Mahani SN. Do insulin replacement and omega3 protect the male reproductive function of the streptozotocin-induced diabetic mice?. *J Nutr Metab* 2017; 2: 6-12.

[13] Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl* 2011; 34(5): 402-10.

[14] Maggavi RR, Pujari SA, Vijaykumar CN. Motility Analysis with Morphology: Study Related to Human Sperm. *Procedia Comput Sci 2019*; 152: 179-85.

[15] Mangiagalli MG, Cesari V, Cerolini S, Luzi F, Toschi I. Effect of lycopene supplementation on semen quality and reproductive performance in rabbit. *Qom Univ Med Sci J* 2012; 20(3): 141-8. [Farsi]

[16] Ni K, Spiess AN, Schuppe HC, Steger K. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. *Andrology* 2016; 4(5): 789-99.

[17] Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003; 24(1): 59-66.

[18] Ammar O, Houas Z, Mehdi M. The association between iron, calcium and oxidative stress in seminal plasma and sperm quality. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019; 26(14): 14097-105.

[19] Akbari H, Saleh M, Heidari MH, Ghaffari Novin M, Azargashb E. Evaluation of sperm parameters and chromatin abnormalities in male infertility using CASA and chromatin dispersion test. *Research in Medicine* 2013; 36(4): 176-83. [Farsi]

[20] Nasr-Esfahani MH, Naghshizadian N, Imani H, Razavi S, Mardani M, Kazemi S, et al. Can sperm protamine deficiency induce sperm premature chromosomal condensation?. *Andrologia* 2006; 38(3): 92-8.

[21] Akbari H, Forouzandeh H, Ghavamizadeh M. Protective Effects of Zinc Supplement on Chromatin Deficiency and Sperm Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Intern Med J* 2020; 27(5): 1-5.

[22] Salehi M, Akbari H, Heidari MH, Molouki A, Murulitharan K, Moeini H, et al. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Mol Reprod Dev* 2013; 80(9): 718-24.

[23] Zini A, Albert O, Robaire B. Assessing sperm chromatin and DNA damage: clinical importance and development of standards. *Andrology* 2014; 2(3): 322-5.

[24] Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. Zinc is an essential element for male fertility: a review of Zn roles in men's health, germination, sperm quality, and fertilization. *J Reprod Infertil* 2018; 19(2): 69–81.

[25] Ray PF, Toure A, Metzler-Guillemain C, Mitchell MJ, Arnoult C, Coutton C. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin Genet* 2017; 91(2): 217-32.

[26] Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839(3): 155-68.

[27] Ménézo Y, Dale B, Cohen M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote* 2010; 18(4): 357-65.

[28] Cardoso JP, Cocuzza M, Elterman D. Optimizing male fertility: oxidative stress and the use of antioxidants. *World J Urol* 2019; 37(6): 1029-34.

[29] Almeer RS, Abdel Moneim AE. Evaluation of the protective effect of olive leaf extract on

[31] Moienie F, Mokhtari M, Sharifi E. The effect of hydro-alcoholic leaf extract of olea europaea on the levels of gonadotropins, sex hormones and spermatogenesis in diabetic rat. *J Anim Physiol Dev* 2014; 5: 11-6.

[32] Heilman J, Anyangwe N, Tran N, Edwards J, Beilstein P, López J. Toxicological evaluation of an olive extract, H35: subchronic toxicity in the rat. *Food Chem Toxicol* 2015; 84: 18-28..

cisplatin-induced testicular damage in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 7(6): 13-8.

[30] Alirezaei M, Kheradmand A, Heydari R, Tanideh N, Neamati S, Rashidipour M. Oleuropein protects against ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis. *Med J Nutrition Metab*2012; 5(3): 205-11.

Protective Effects of Olive Leaf Hydroalcoholic Extract on Sperm Parameters and Chromatin Quality in NMRI Mice Exposed to the Insecticide Mancozeb: An Experimental Study

M. Ashkanani[1], H. Akbari[2]

Received:25/11/20 Sent for Revision: 26/112/20 Received Revised Manuscript:04/04/21 Accepted:05/04/21

Background and Objectives: Improper use of chemical pesticides such as Mancozeb (MZB) leads to genital injuries. The aim of this study was to determine the effect of different doses of olive leaf extract (OLE) on reproductive damage in male mice exposed to MZB.

Materials and Methods: In this experimental study, 64 adult male NMRI mice (10 to 12 weeks) were randomly divided into 8 groups (n=8) including control (Normal saline recipient), Mancozeb (MZB) recipient (500 mg/kg), MZB (500 mg/kg) + (200, 300 and 400 mg of OLE) and OLE group at doses of (200, 300 and 400 mg) and were treated by gavage every other day for 35 days. Then, the mice were killed by cervical dislocation; heart blood samples were drawn to measure serum testosterone level and epididymis removed to examine sperm. Different indicators of sperm analysis (number, motility and morphology), protamine and chromatin health were examined. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test.

Results: The lowest protamine levels (p=0.001) and the lowest alive sperms (p=0.005) were seen in the MZB group. There was a significant decrease in head abnormalities (p=0.003) and immobile sperm (p< 0.001) in OLE groups. At a dose of 200 mg/kg OLE, the highest chromatin health (p<0.001), the highest rapid sperm motility (p=0.037) and the highest testosterone level (p=0.001) were observed.

Conclusion: The highest efficacy of OLE was seen at a dose of 200 mg/kg; therefore, consumption of this extract in the same dose can probably be considered as a supportive compound in the diet of high-risk people exposed to MZB.

Key words: Mancozeb, Sperm, Olive leaf extract, Mice, Infertility

Funding: This study was funded by Shiraz Branch of Islamic Azad University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Shiraz Branch of Islamic Azad University approved the study (IR.IAU.SHIRAZ.REC.1399.027).

How to cite this article: Ashkanani M, Akbari H. Protective Effects of Olive Leaf Hydroalcoholic Extract on Sperm Parameters and Chromatin Quality in NMRI Mice Exposed to the Insecticide Mancozeb: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2021; 20 (2): 147-62. [Farsi]

1- MSc Student of Biochemistry , Department of Biochemistry ,Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
ORCID: 0000-0001-8729-1696
2- Assistant professor of anatomical sciences, Cellular and Molecular Research Center, Gerash University of Medical Sciences, Gerash, Iran,
ORCID: 0000-0002-9417-1390
(Corresponding Author) Tel: (071) 52448101, Fax: (071) 52452339, E-mail address: anaakbari91@gmail.com