نشریه علوم درمانگاهی دامپزشکی ایران؛ ۱۴۰۰؛ ۱۵(۲): ۵۱-۵۸.

ارزیابی اثر استات سرب بر شاخص‌های اسپرم موالید موش صحرایی در دوره‌های پیرازایشی و شیرواری

احسان رومیانی[۱]، حسن مروتی[۱*]، جواد صادقی‌نژاد[۲] و ساره نجف اسعدی[۱]

۱. بخش بافت‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۲. بخش آناتومی و جنین‌شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران- ایران.

دریافت: ۱۷ دی‌ماه ۱۳۹۹ **پذیرش:** ۳۰ مردادماه ۱۴۰۰

چکیده

هدف این پژوهش، بررسی اثرات استات سرب روی شاخص‌های اسپرم موالید در موش های صحرایی نر نژاد ویستار به دنبال مصرف سرب از سوی مادر در دوره‌های پیرازایشی و شیرواری بود. در این پژوهش تجربی تعداد ۳۵ سر موش صحرایی ویستار به صورت تصادفی در ۷ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. در طول دوره آزمایش، موش های گروه‌های کنترل و شم به ترتیب به آب آشامیدنی و ترکیب آب و اسید استیک گلاسیال دسترسی داشتند. گروه‌های تجربی (زیر گروه‌های گروه شم) شامل گروه‌های قبل بارداری، بارداری، شیردهی، بارداری- شیردهی و قبل بارداری- بارداری شیردهی در طول دوره‌های ذکر شده به ترکیب ۲ گرم/لیتر استات سرب- ۵۰۰/لیتر میکرولیتر اسید استیک در آب دسترسی داشتند. در روز ۶۳ بعد از تولد، همه موالید در آزمایشگاه جنین‌شناسی آسان‌کشی شده و نمونه‌های اسپرم دریافت گردید. پس از آماده سازی نمونه، شاخص‌های تعداد، زنده‌مانی، کیفیت کروماتین، بلوغ، اشکال غیرطبیعی و تحرک (پیش‌رونده، غیر پیش‌رونده و بدون تحرک) ارزیابی شد. از نظر آماری، استات‌سرب دارای اثرات قابل توجهی روی شاخص‌های مورد بررسی بود، به‌طوری که تعداد، تحرک (پیش‌رونده و ساکن)، زنده‌مانی، بلوغ اسپرم و بروز اشکال غیرطبیعی اسپرم در گروه‌های تجربی کاهشی معنی‌دار را نشان دادند ($P<۰/۰۵$)؛ این در حالی است که دو فاکتور کیفیت کروماتین و حرکت غیر پیش‌رونده اسپرم تغییرات معنی‌داری را نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). از نتایج پژوهش حاضر می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که مواجهه با استات‌سرب، در دوره پیرازایشی دارای اثرات منفی معنی‌داری روی شاخص‌های اسپرم است.

واژه‌های کلیدی: شاخص‌های اسپرم، موش صحرایی، استات سرب، دوره‌های پیرازایشی و شیرواری.

مقدمه

ناباروری یک مسأله جهانی است که به‌طور متوسط در حدود ۸ تا ۱۲ درصد از انسان‌ها درگیر آن هستند (۲۵). کاهش تعداد اسپرم، یک عامل مهم در ناباروری است (۳۱). بیضه پستانداران نسبت به ترکیبات سمی که می‌توانند روند تولید اسپرم را تحت تأثیر قرار دهند حساس است که این خود می‌تواند تغییراتی را در کیفیت منی و باروری ایجاد کند (۲۶).

اثرات زیان‌بار مربوط به مواجهه با فلزات سنگین موجود در محیط زیست یک مسأله مهم و جهانی است. سرب فراوان‌ترین ماده فلزی سمی موجود در طبیعت است (۱۱) که به‌طور طبیعی در طبیعت وجود دارد، اما سطوح بالای آن به‌واسطه فعالیت‌های بشر وارد محیط می‌شود و می‌تواند مشکلات متعددی را از طریق آلودگی‌های محیطی برای سلامت ایجاد کند (۷). مطالعات سم‌شناسی نشان داده‌اند که سرب دارای اثرات منفی روی سیستم اعصاب مرکزی، سیستم اعصاب محیطی، سیستم قلبی عروقی، سیستم درون‌ریز، سیستم ایمنی، سیستم گوارشی، بافت خونی، سیستم ادراری، سیستم تولیدمثلی نر و ماده است و نیز موجب ناهنجاری‌های کروموزومی می‌شود (۳۳ و ۲۹). سرب می‌تواند از سد خونی-بیضه‌ای عبور و بیضه‌ها و دیگر اندام‌های ضمیمه را متأثر کند (۱۳ و ۳۲). تجمع سرب در بیضه و اپیدیدیم موجب تأثیر روی سلول‌های زایای جنسی در سطوح مختلف تمایز (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتید یا اسپرماتوزوآ) می‌شود (۴)، به‌علاوه، سرب اثراتی منفی روی تعداد اسپرم، زنده‌مانی و تحرک اسپرماتوزوئیدها نیز دارد (۸)، سرب

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: hmorovvati@ut.ac.ir

همچنین یک ترکیب استروژنیک است که ممکن است با عبور از سد خونی-جفتی تکامل جنین را هم متأثر کند (۶، ۱۵ و ۳۵).

گزارش‌های مختلفی مبنی بر اثرات سمی سرب روی تکوین ارگان‌های مختلف و مراحل فیزیولوژیکی آن‌ها نظیر دستگاه‌های خون‌ساز، ادراری-تناسلی، قلبی عروقی و دستگاه عصبی مرکزی وجود دارد. شدت تأثیر سمیت سرب بر این اندام‌ها به میزان زمان درمعرض قرارگرفتن، مقدار آن و مرحله تکوین بستگی دارد. در این راستا در مطالعات مختلفی اثرات استات‌سرب روی دستگاه تولیدمثلی رت‌های نر بررسی شده است (۱۰، ۳۴ و ۱۷). در سال ۲۰۱۵ Nkechi و همکاران دژنره شدن ساختار بافت، نکروزه و واکوئله شدن سلول‌های اسپرماتوژنیک درحال رشد در لوله‌های منی‌ساز، غشای پایه ضخیم شده، کاهش سلول‌های لیدیگ و نیز کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم در اثر تجویز استات سرب در بیضه موش های صحرایی آلبینو را گزارش کردند (۱۴). Ekeh و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ تغییراتی مانند تخریب ساختار بافتی بیضه، نکروز، واکوئله شدن، حضور سلول‌های اسپرماتوژنیک در حال رشد در لوله‌های منی‌ساز، غشای پایه ضخیم شده، کاهش سلول‌های لیدیگ و کاهش تعداد اسپرم را به صورت وابسته به دوز در اثر مواجهه موش های صحرایی نر آلبینو با استات‌سرب در بافت بیضه را گزارش کردند (۱۰). آتروفی لوله‌های منی‌ساز، ادم بین توبولی در بیضه و اختلال در تولید اسپرم نیز در پژوهش Suradkar و همکاران به منظور بررسی اثرات استات‌سرب در موش صحرایی گزارش شد (۳۴).

در سال‌های اخیر برای جلوگیری از در معرض قرارگرفتن زنان باردار در مناطق آلوده با سرب به منظور حفظ باروری و سلامت فرزندان، توصیه‌های فراوانی می‌شود، ولی با این وجود اجتناب از در معرض سرب قرارگرفتن تقریباً امکان پذیر نیست. علاوه برآن، تجمع مقادیر اندک سرب در مادران باردار نیز منجر به تغییراتی در جنین می‌شود که همچنان ناشناخته باقی مانده‌اند. براساس گزارش‌های موجود، آلودگی سرب در مادر، می‌تواند از طریق شیر به نوزادان هم منتقل شود (۳ و ۲۸).

علی‌رغم آنچه گفته شد، مطالعه‌ای در زمینه مسمومیت مادران با سرب و تأثیر آن روی شاخص‌های اسپرم صورت نگرفته است، لذا پژوهش حاضر به منظور بررسی و ارزیابی شاخص‌های اسپرم موالید متعاقب مصرف استات‌سرب از سوی مادران طی دوره‌های قبل از آبستنی، آبستنی و شیرواری در مدل حیوانی رت صورت گرفت.

مواد و روش‌کار

ایـن پژوهش تجربی روی ۳۵ سر موش صحرایی بالغ ماده نژاد ویستار انجام شد. در تمام مراحل پژوهش دستورالعمل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. حیوانات با حفظ شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۶-۲۰ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به آب و غذای کافی نگه‌داری شدند؛ پس از عادت بـا شـرایط محیط، برای جفت‌گیری، دو رت موش صحرایی به ازای یک موش صحرایی نر در هر قفس قرار داده شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت، پلاک واژنی بررسی و موش های صحرایی بارور جداسازی شدند. موش های صحرایی بارور به صورت تصادفی در ۷ گروه ۵ تایی به شرح زیر تقسیم گردیدند:

گروه اول (کنترل): از ۲۱ روز قبل از آبستنی تا پایان دوره پژوهش آب آشامیدنی معمولی دسترسی داشتند.

گروه دوم (شم): از ۲۱ روز قبل از آبستنی تا پایان دوره پژوهش به آب آشامیدنی حاوی ۰/۰۵ درصد اسیداستیک گلاسیال دسترسی داشتند.

گروه سوم (پیش آبستنی): در دوره ۲۱ روزه قبل-آبستنی به آب آشامیدنی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر اسید استیک گلاسیال و استات‌سرب ۰/۲ درصد (۲ گرم در لیتر) دسترسی داشتند.

گروه چهارم (آبستنی): در دوره ۲۱ روزه آبستنی به آب آشامیدنی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر اسید استیک گلاسیال و ۰/۲ درصد (۲ گرم در لیتر) استات‌سرب دسترسی داشتند.

گروه پنجم (شیرواری): در دوره ۲۱ روزه شیرواری به آب آشامیدنی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر اسید استیک گلاسیال و ۰/۲ درصد (۲ گرم در لیتر) استات‌سرب دسترسی داشتند.

گروه ششم (آبستنی-شیرواری): در دو دوره ۲۱ روزه آبستنی و شیرواری به آب آشامیدنی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر اسید استیک گلاسیال و ۰/۲ درصد (۲ گرم در لیتر) استات‌سرب دسترسی داشتند.

گروه هفتم (قبل آبستنی-آبستنی-شیروارری): در سه دوره ۲۱ روزه قبل از آبستنی، آبستنی و شیرواری به آب آشامیدنی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر اسید استیک گلاسیال و ۰/۲ درصد (۲ گرم در لیتر) استات‌سرب دسترسی داشتند.

از روز بیست و یکم بعد از تولد، موالید نر از موش‌های مادر جدا و در قفس‌های جداگانه نگه‌داری شدند و پس از بلوغ کامل در روز شصت و سوم و پس از آسان‌کشی، استحصال اسپرم از دم اپیدیدیم انجام شد. بدین منظور، پس از باز کردن محوطه شکمی، دم اپیدیدیم از بیضه جدا و پس از ایجاد چند برش در آن، به میکروتیوب حاوی PBS منتقل شد، سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه برای خروج اسپرم‌ها قرار گرفت؛ در نهایت به منظور ارزیابی شاخص‌های اسپرم، خصوصیاتی از جمله تعداد، تحرک، قابلیت حیات، بلوغ و کیفیت کروماتین هسته اسپرم محاسبه شد (۲۴).

برای شمارش اسپرم‌ها، در داخل یک میکروتیوب یک میلی‌لیتری ۳۸۰ میکرولیتر PBS ریخته و سپس به آن ۲۰ میکرولیتر اسپرم اضافه شد تا رقت ۱ به ۲۰ آن تهیه شود. پس از مخلوط شدن محلول به‌دست آمده، ۱۰ میکرولیتر از آن روی لام نئوبار دارای لامل سنگی ریخته شد و شمارش تعداد اسپرم‌ها انجام شد. برای محاسبه میزان اسپرم‌های زنده، در حدود ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون را در گوشه لام ریخته و پس از رنگ‌آمیزی با ائوزین-نیگروزین با یک لام دیگر از آن اسمیر تهیه شد، سپس لام در هوای اتاق خشک و با میکروسکوپ نوری مشاهده شد. نتایج به صورت درصد اسپرم‌های زنده نسبت به کل اسپرم‌های مشاهده شده (حداقل ۲۰۰ عدد) بیان گردید. به‌منظور ارزیابی کیفیت کروماتین اسپرم، از سوسپانسیون اسپرم ۲۰ میکرولیتر برداشته و در گوشه لام ریخته شد، سپس با یک لام دیگر گسترش تهیه و پس از خشک‌شدن در محیط آزمایشگاه، رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج انجام شد. در این رنگ‌آمیزی نتایج به صورت درصد اسپرم‌های دارای DNA شکسته شده (رنگ زرد تا قرمز) به کل اسپرم‌های مشاهده شده و تعداد اسپرم‌های دارای DNA سالم (سبز رنگ) به تعداد اسپرم‌های مشاهده شده، بیان شد. در مرحله بعد برای ارزیابی بلوغ و شکل طبیعی اسپرم، از سوسپانسیون اسپرم ۲۰ میکرولیتر برداشته و در گوشه لام ریخته شد، سپس با یک لام دیگر گسترش تهیه و پس از خشک شدن در محیط آزمایشگاه، رنگ‌آمیزی آنیلین‌بلو انجام شد. در این رنگ‌آمیزی اسپرم‌های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی تیره مایل به خاکستری دیده شده و رنگ‌پذیری در اسپرم‌های بالغ کمتر بود. نتایج براساس درصد بیان شد. میزان اسپرم‌های غیرطبیعی نیز بر اساس شکل ظاهری آن‌ها و برحسب درصد محاسبه شد. برای ارزیابی تحرک اسپرم نیز محیط کشت حاوی اپیدیدیم، مخلوط شده و از آن دو گسترش مرطوب حدود ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که به سرعت بعد از لامل‌گذاری، با بزرگ‌نمایی ۴۰۰× میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. در گسترش، سه نوع حرکت برای اسپرم درنظر گرفته شد (حرکت پیشرونده (PR)، حرکت غیرپیش‌رونده (NP) و بی‌حرکت (IM)). حدود ۲۰۰ اسپرم در هر لام شمارش و تعداد اسپرم‌ها به تفکیک سه نوع حرکت در هر دو گسترش به صورت درصد بیان شد.

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف‌معیار بیان شدند. به‌منظور مقایسه میانگین‌های حاصل از این پژوهش، داده-ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون توکی ارزیابی شدند.

نتایج

مواجهه با استات‌سرب موجب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم در گروه‌های تجربی با یک استثنا نسبت به گروه-های کنترل و شم شد ($P<۰/۰۵$). به طوری که کاهش تعداد اسپرم در گروه شیرواری اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های کنترل نشان نداد ($P>۰/۰۵$). در بین گروه‌های تجربی نیز میانگین حاصل از گروه شیرواری با میانگین-های حاصل از سایر گروه‌های تجربی، بجز گروه پیش-آبستنی، دارای اختلافی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). مواجهه با استات‌سرب سبب کاهش معنی‌دار حرکت پیشرونده

اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار نسبت به گروه‌های کنترل و شم شد، در بین گروه‌های تجربی نیز اختلاف معنی‌دار در مقایسه میانگین‌های مربوط به حرکت پیش‌رونده فقط در بین گروه‌های شیرواری و آبستنی-شیرواری مشاهده شد (P<۰/۰۵). در بررسی حرکت غیر پیش‌رونده اسپرم‌ها، اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد (P>۰/۰۵). تعداد اسپرم‌های بدون تحرک در گروه-های تیمار شده با استات‌سرب افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل و شم نشان داد. در گروه‌های پیش آبستنی و آبستنی-شیرواری اختلاف معنی‌داری در تعداد اسپرم-های بدون تحرک ثبت شد (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین ± انحراف معیار (SD) تعداد (میلیون/میلی‌لیتر) و تحرک (درصد) اسپرم رت‌ها (هر گروه ۵ سر موش صحرایی) در دوره پیرازایشی و شیرواری در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه	تعداد اسپرم	حرکت پیشرونده	حرکت غیر پیشرونده	ساکن
کنترل	۳۹ ± ۴/۳۰ ^{ab}	۵۶/۷ ± ۶/۰۴ ^{a}	۲۴/۶ ± ۶/۹۹ ^{a}	۱۸/۷ ± ۵/۸ ^{a}
شم	۴۵/۵ ± ۶/۹ ^{a}	۶۴/۷ ± ۴/۶۹ ^{a}	۲۲/۲ ± ۴/۲۲ ^{a}	۱۳/۱ ± ۱/۹۱ ^{a}
پیش آبستنی	۱۶/۵ ± ۲/۸۵ ^{cd}	۲۶/۷ ± ۲/۰۱ ^{bc}	۲۵ ± ۰/۷۹ ^{a}	۵۶/۴ ± ۱/۹۸ ^{c}
آبستنی	۱۸/۶ ± ۸/۱۲ ^{d}	۲۲/۲ ± ۱/۹۸ ^{bc}	۲۹/۹ ± ۲/۲۷ ^{a}	۴۷/۹ ± ۱/۳۴ ^{bc}
شیرواری	۲۸/۸ ± ۷/۴۲ ^{bc}	۱۵/۵ ± ۱۱/۲۴ ^{c}	۳۰/۷ ± ۶/۶۲ ^{a}	۵۳/۸ ± ۱۵/۸۸ ^{bc}
آبستنی-شیرواری	۱۶/۵ ± ۳/۳۵ ^{d}	۲۷ ± ۳/۸۵ ^{b}	۳۲/۹ ± ۹/۰۷ ^{a}	۳۷/۴ ± ۱۵/۵۱ ^{b}
پیش آبستنی- آبستنی- شیرواری	۱۶/۶ ± ۵/۱۶ ^{d}	۲۵/۵ ± ۳/۲۲ ^{bc}	۲۸/۲ ± ۳/۶۵ ^{a}	۴۶/۳ ± ۱۰/۶۴ ^{bc}

^{a,b,c,d}حروف غیر همسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند.

درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار شده با استات‌سرب با یک استثنا، کاهش معنی‌داری نسبت درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها در گروه‌های کنترل و شم نشان داد (P<۰/۰۵). در این میان، کاهش درصد زنده‌مانی اسپرم-های گروه شیرواری اختلاف معنی‌داری با گروه‌های کنترل و شم نشان نداد. درصد زنده‌مانی اسپرم در موش های صحرایی گروه‌های پیش‌آبستنی و پیش‌آبستنی-آبستنی--شیرواری با سایر گروه‌های تجربی بجز گروه آبستنی و گروه آبستنی با گروه شیرواری اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). درصد بلوغ اسپرم‌ها در گروه‌های تیمار شده با استات‌سرب نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی-داری نشان داد (P<۰/۰۵). در گروه شم، درصد بلوغ اسپرم به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های آبستنی، آبستنی- شیرواری و پیش آبستنی- آبستنی- شیرواری بود (P<0.05). در بین گروه‌های تیمار شده با استات‌سرب نیز درصد اسپرم‌های بالغ در گروه آبستنی با گروه‌های پیش‌آبستنی و شیرواری و گروه پیش‌آبستنی- آبستنی-شیرواری با سایر گروه‌ها دارای اختلافی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). میانگین درصد اسپرم‌های دارای شکل غیرطبیعی در گروه‌های تیمار شده با استات‌سرب، بجز در گروه پیش‌آبستنی، به‌طور معنی‌داری از گروه‌های کنترل و شم بیشتر بود (P<۰/۰۵). اختلاف گروه‌های آبستنی و پیش آبستنی-آبستنی-شیرواری با سایر گروه‌های تجربی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). افزایش تعداد اسپرم‌های با شکل نامتعارف در گروه شیرواری نسبت به گروه آبستنی-شیرواری دارای اختلافی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). مقایسه داده‌های منتج از رنگ‌آمیزی آکریدین‌اورنج نشان داد که آسیب وارده به DNA اسپرم موش های صحرایی در خلال مواجهه با استات‌سرب اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های مختلف مورد مطالعه ایجاد نکرده است (P>۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲- Mean±SD نتایج مربوط به شاخص‌های قابلیت حیات، ارزیابی بلوغ، شکل طبیعی و آسیب DNA اسپرم رت‌ها (هر گروه ۵ سر موش صحرایی) در دوره‌های پیرازایشی و شیرواری در گروه‌های مختلف آزمایشی

گروه	زنده‌مانی اسپرم (٪)	اسپرم بالغ (٪)	شکل غیرطبیعی اسپرم (٪)	اسپرم با DNA سالم (٪)
کنترل	۸۷/۵ ± ۴/۷۶ [a]	۸۹/۶ ± ۲/۷ [e]	۲/۷ ± ۰/۵۷ [a]	۹۹/۷ ± ۱/۸۴ [a]
شم	۸۷/۱۶ ± ۱/۰۴ [a]	۸۴ ± ۱/۴۵ [ab]	۳/۱ ± ۱/۲۷ [a]	۹۹/۴ ± ۱/۹۱ [a]
پیش آبستنی	۶۸/۳۳ ± ۲/۲۵ [d]	۷۸/۳۸ ± ۵/۰۸ [bc]	۵/۸ ± ۱/۶۴ [abc]	۹۶/۹ ± ۱/۴۴ [a]
آبستنی	۷۵/۶۶ ± ۴/۰۱ [cd]	۶۷/۵ ± ۲/۹۷ [d]	۱۵/۲ ± ۱/۸۲ [d]	۹۴/۶۸ ± ۱/۹۸ [a]
شیرواری	۸۵/۱۶ ± ۱/۰۴ [bc]	۷۸/۳ ± ۲/۱۹ [bc]	۸/۳ ± ۱/۳ [b]	۹۵/۴۵ ± ۱/۳۳ [a]
آبستنی-شیرواری	۷۸±۱ [bc]	۷۲/۲ ± ۴/۱۴ [cd]	۹/۸۵ ± ۲/۷۱ [c]	۹۴/۶۹ ± ۱/۰۱ [a]
پیش آبستنی- آبستنی- شیرواری	۷۰/۱۶ ± ۱/۸۹ [d]	۵۶/۶ ± ۱/۹۸ [e]	۱۵ ± ۱/۴۵ [d]	۹۴ ± ۱/۴۲ [a]

[a,b,c,d]حروف غیر همسان در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

بحث

تأثیر ترکیبات سمی موجود در محیط روی باروری جنس نر و به‌ویژه در کشورهای صنعتی یک مسأله مهم در موضوع سلامت است. بیضه یکی از مهم‌ترین اندام‌های هدف در مسمومیت با سرب است (۲۷). تولیدمثل جنس نر اساساً وابسته به تولید اسپرم (اسپرماتوژنز) است که به واسطه آن اپیتلیوم زایای نابالغ متحمل تقسیم، تمایز و میوز شده و نهایتاً اسپرماتیدها را تولید می‌کند (۲۵). بیضه علاوه بر تولید اسپرم، در ترشح هورمون‌های جنسی و پدیده فیدبک روی هیپوتالاموس و هیپوفیز به منظور ترشح گنادوتروپین‌ها دخالت دارد (۱۸). مواجهه انسان‌ها و حیوانات با فلزات سنگین مانند سرب، کادمیوم، جیوه و آرسنیک به شدت باروری جنس نر را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). مطالعات متعددی در مورد اثرات سرب روی سیستم تولیدمثلی و در نتیجه استفاده از سرب در صنعت، پزشکی و لوازم آرایشی انجام گرفته است (۱۹). سمیت سرب سبب وارد آمدن جراحات وابسته به دوز در بافت بیضه از تغییرات دژنراتیو اپیتلیوم زایا تا تغییرات نکروبیوتیک به همراه توقف روند اسپرماتوژنز می‌شود (۱۲ و ۲۲). مواجهه با سرب سبب القای آسیب به DNA اسپرماتوزوا و تغییر در شاخص‌های آن می‌شود (۲۱).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که مواجهه با استات-سرب در طول دوره پیرازایشی و شیرواری موجب کاهش معنی‌دار تعداد، تحرک، زنده‌مانی و همچنین افزایش معنی‌دار تعداد اسپرم‌های نابالغ در موش صحرایی می‌شود. نتایج حاصل از پژوهش حاضر با پژوهش‌های مشابهی که از سوی مروتی و همکاران، Asadpour و همکاران، Hamadouche و همکاران و Dorostghoal و همکاران انجام شده است در یک راستا بود (۵، ۹، ۱۷ و ۲۴). Hassan و همکاران اظهار داشتند که در موش های صحرایی مواجه شده با استات‌سرب تعداد اسپرم و تحرک آن (۰/۳۰ ± ۲۴/۴۴ میلیون در میلی لیتر و ۰/۲۶ ± ۶۲/۲۶ درصد) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی-داری داشته است (۰/۴۳ ± ۳۶/۳۸ میلیون در میلی لیتر و ۰/۶۳ ± ۷۴/۹۴ درصد) (۱۸). در پژوهش حاضر نیز مواجهه با استات‌سرب موجب کاهش معنی‌دار تعداد اسپرم نسبت به گروه‌های کنترل و شم شد، ضمن این که در بین گروه‌های تیمار نیز اختلافات معنی‌داری مشاهده شد. تحرک اسپرم‌ها نیز در گروه‌های مختلف دستخوش تغییراتی شد، بدین صورت که گروه‌های تیمار شده با استات‌سرب کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های کنترل نشان دادند. در بین گروه‌های مواجه شده با استات‌سرب نیز اختلافات معنی‌داری ثبت شد ($P<0/05$)، بر همین اساس و طبق نظر Monga و همکاران و Li و همکاران می‌توان این طور بیان کرد که: سرب منجر به کاهش قابل ملاحظه در تعداد و تحرک اسپرم‌ها می‌شود (۲۱ و ۲۳) که طبق نظر Rao و همکاران این تغییرات می‌تواند مربوط به اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز باشد که مستقیماً

روی اسپرماتوژنز اثر می‌گذارد (۲۹) و اعمالی مانند تأخیر در روند اسپرم‌زایی و رهاشدن سلول‌های اسپرماتوژنیک نابالغ به لومن لوله‌های سمینیفر را سبب می‌شود (۲۰).

در مطالعه حاضر مواجهه با استات‌سرب تأثیرات منفی معنی‌داری روی DNA اسپرم‌ها نداشت. در سال ۱۳۹۶ مروتی و همکاران اظهار داشتند که میزان اسپرم‌های دارای DNA سالم در گروه متأثر از سرب در مقایسه با سایر گروه‌های مورد نظر کاهش معنی‌داری نداشته است (۲۴)، بنابراین نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه ایشان هم‌سو است. بر این اساس می‌توان این طور نتیجه گرفت که اثرات منفی استات‌سرب روی DNA اسپرم چندان چشم‌گیر نیست.

در پژوهش حاضر، مواجهه با استات‌سرب سبب بروز طیفی از تغییرات معنی‌دار در تعداد، تحرک، زنده‌مانی و درصد اسپرم‌های با شکل غیرطبیعی در موش صحرایی شد که طبق گفته Akinola و همکاران، توانایی سرب در عبور از خلال سد خونی- بیضه‌ای موجب القای اثرات زیان‌باری روی اسپرماتوسیت‌ها، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوآها می‌شود (۲). همانند Vallverdu و همکاران، Hassan و همکاران اظهار داشتند که مواجهه با مقادیر زیر حد مزمن سرب شاخص‌های اسپرم مانند تعداد، تحرک و زنده‌مانی آن را همانند درصد اسپرم‌های غیرطبیعی تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۷ و۱۸). Elgawish و Abdelrazek در سال ۲۰۱۴ در پژوهشی روی رت‌های آلبینو بیان کردند که مواجهه رت‌ها با استات‌سرب سبب بروز تغییرات معنی‌داری در تعداد، تحرک، زنده‌مانی و بروز اشکال غیرطبیعی در اسپرم‌های آن‌ها می‌شود (۱۱).

Akinola و همکاران در مطالعه خود دریافتند که استات‌سرب به صورت دهانی در موش های صحرایی مورد پژوهش، سبب کاهش معنی‌دار تعداد و تحرک اسپرم‌ها و نیز افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های دفرمه و سلول‌های مرده می‌شود (۲). Saleh در سال ۲۰۱۸ اظهار داشت که استات‌سرب سبب کاهش معنی‌دار در تعداد و تحرک اسپرم‌های موش صحرایی در مقایسه با گروه کنترل شده است، همچنین درصد اسپرم‌های دارای اشکال غیرطبیعی در گروه تیمار با استات‌سرب افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشته است (۳۱). Godinez-Solis و همکاران در سال ۲۰۱۹ بیان کردند که غلظت (تعداد) اسپرم، تحرک و زنده‌مانی آن در مایس تحت تأثیر سرب متحمل تغییرات معنی‌داری نشده است (۱۵) که نتایج پژوهش حاضر با نتایج ایشان هم‌سو نیست.

در مطالعه حاضر درصد اسپرم‌های دارای شکل طبیعی کاهش معنی‌داری نشان داد که با نتایج ارائه شده از سوی Godinez-Solis و همکاران در یک راستاست(۱۵). ایشان تغییرات عمده در ریخت‌شناسی اسپرم‌ها را عمدتاً در ناحیه سر و سپس در ناحیه دم گزارش کردند. در پژوهش حاضر نیز درصد اسپرم‌های دارای اشکال غیرطبیعی در گروه‌های متأثر از استات‌سرب نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P<0.05$) و البته عمده تغییرات شکل اسپرم‌ها عمدتاً در ناحیه دم آن‌ها و سپس در ناحیه سر مشاهده شد. Saleh در سال ۲۰۱۸ بیشترین تغییرات ایجاد شده در شکل اسپرم‌ها را مربوط به تغییر در ناحیه دم بیان کرده است که نتیجه مشاهدات پژوهش حاضر با نتایج مطالعه ایشان در یک راستاست (۳۱).

با توجه به نتایج این مطالعه می توان این طور بیان کرد که مواجهه موش های صحرایی در دوره پیرازایشی با مقدار ۲ گرم در لیتر (۰/۲ درصد) استات سرب سبب ایجاد تغییرات معنی داری در شاخص‌های اسپرم مانند تعداد، تحرک، زنده مانی و بلوغ می‌شود، سرب همچنین تعداد اسپرم‌های دارای شکل نامتعارف را افزایش داد که این تغییرات عمدتاً در ناحیه دم و سپس در ناحیه سر اسپرم ها مشاهده شد. استات سرب در میزان ذکر شده، اما تأثیرات منفی معنی‌داری روی تعداد اسپرم‌های با DNA آسیب دیده نداشت، به عبارتی سرب سبب بروز اختلاف معنی‌داری در تعداد اسپرم‌های با DNA سالم و آسیب دیده نشد.

قدردانی و تشکر

نویسندگان این مقاله از افرادی که در راستای انجام این پژوهش همکاری کرده‌اند، صمیمانه تشکر می‌کنند. پژوهش حاضر بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی رشته بافت‌شناسی مقایسه‌ای دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و به کد طرح ثبت شده به شماره ۳۰۰۲۹/۶/۱۶ و کد اخلاق به شماره ۷۶۱۲۰۳۲ است.

منابع

1- Adamkovicova, M.; Toman, R.; Martiniakova, M.; Omelka, R.; Babosova, R.; Krajcovicova, V. et al.; Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. Reprod. Biol. Endocrinol.; 2016; 14(42):7.
2- Akinola, O.B.; Oyewopo, A.O.; Biliaminu, S.A.; Aremu, Sh.A.; Afolayan, S.T. and Sanni, G.O.; Testicular histomorphometry and semen quality of adult Wistar rats following juvenile oral lead intoxication. Eur. J. Anat.; 2015; 19(1):65-72.
3- Antonio-Garcia, M.T. and Masso-Gonzalez, E.L.; Toxic effects of perinatal lead exposure on the brain of rats:Involvement of oxidative stress and the benefical role of antioxidants. Food Chem. Toxicol.; 2008; 46:2086-095.
4- Apostoli, P.; Porru, S. and Bisanti, L.; Critical aspects of male fertility in the assessment of exposure to lead. Scand. J. Work. Environ. Health.; 1999; 25:40-3.
5- Asadpour, R.; Shahbazfar, A.; Kianifard, D.; Azari, M. and Zaboli, N.; Comparison of the protective effects of garlic (Allium sativum L) extract, vitamin E and N acetyl cysteine on testis structure and sperm quality in rats treated with lead acetate. Rev. Med. Vet.; 2013; 164:27-33.
6- Baghurst, P.A.; Robertson, E.F.; Oldfield, R.K.; King, B.M.; McMichael, A.J.; Vimpani, G.V. et al.; Lead in placenta, membranes, and umbilical cord in relation to pregnancy outcome in a lead-smelter community. Environ. Health. Perspect.; 1991; 90:315-20.
7- BaSalamah, M.A.; Abdelghany, A.H.; El-Boshi, M.; Ahmad, J.; Idris, Sh. and Refaat, B.; Vitamin D alleviates lead induced renal and testicular injuries by immunomodulatory and antioxidant mechanisms in rats. Sci. Rep.; 2018; 8(4853):1-13.
8- Chowdhury, A.R.; Recent advances in heavy metals induced effect on male reproductive function – A retrospective. Al Ameen J. Med. Sci.; 2009; 2:37-42.
9- Dorostghoal, M.; Seyyednejad, S. and Jabari, A.; Protective effects of Fumaria parviflora L. on lead induced testicular toxicity in male rats. Andrologia.; 2014; 46:437-46.
10- Ekeh, F.N.; Ikele, Ch.B. and Rose, O.; The Effect of Lead Acetate on the Testes of Male Albino Rats. Adv. Life Sci. Technol.; 2015; 38:70-4.
11- Elgawish, R.A. and Abdelrazek, H.M.A.; Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. Toxicol. Rep.; 2014; 1:795-01.
12- El-Neweshy, M.S. and El-Sayed, Y.S.; Influence of vitamin C supplementation on leadinduced histopathological alterations in male rats. Exp. Toxicol. Pathol.; 2011; 63:221-27.
13- Fair, J.M. and Ricklefs, R.E.; Physiological growth and immune responses of Japanese quail chicks to the multiple stressors of immunological challenge and lead shot. Arch. Environ. Con. Tox.; 2002; 42:77-7.
14- Felicia Nkechi, E.; Chika bright, I. and Rose, O.; The Effect of Lead Acetate on the Testes of Male Albino Rats. Adv. Life Sci. Technol.; 2015; 38: 70-4.
15- Godinez-Solisa, Y.; Solis-Herediaa, M.de.J.; Roa-Espitiab, A.; Yuliana Parra-Foreroa, L.O.; Hernandez-Gonzalezb, E.; Hernandez-Ochoaa, I. et al.; Low concentrations of lead decrease the sperm fertilization ability by altering the acrosome reaction in mice. Oxicol. Appl. Pharmacol.; 2019; 380:89.
16- Goyer, R.A.; Transplacental transport of lead. Environ. Health Perspect.; 1990; 89:101-05.
17- Hamadouche, N.A.; Sadi, N.; Kharoubi, O.; Slimani, M. and Aoues, A.; The protective effect of vitamin E against genotoxicity of lead acetate intraperitoneal administration in male rat. Arch. Biol. Sci.; 2013; 65:1435-445.
18- Hassan, E.; El-Neweshy, M.; Hassan, M. and Noredin, A.; Thymoquinone attenuates testicular and spermotoxicity following subchronic lead exposure in male rats: Possible mechanisms are involved. Life Sci.; 2019; 230:132-40.
19- Kumar, S.R. and Devi, A.S.; Lead toxicity on male reproductive system and its mechanism: a review. Res. J. Pharm. Technol.; 2018; 11:1228-232.
20- Landrigan, P.J.; Boffetta, P. and Apostoli, P.; The reproductive toxicity and carcinogenicity of lead: a critical review. Am. J. Ind. Med.; 2000; 38:231-43.
21- Li, C.; Zhao, K.; Zhang, H.; Liu, L.; Xiong, F.; Wang, K. et al.; Lead exposure reduces sperm quality and DNA integrity in mice. Environ. Toxicol.; 2018; 33:594-02.
22- Mabrouk, A.; Therapeutic effect of thymoquinone against lead-induced testicular histological damage in male Wistar rats. Andrologia.; 2018; 50(6): e13014.
23- Monga, R.; Ghai, S.; Datta, T.K. and Singh, D.; Tissue-specific promoter methylation and histone modification regulate CYP19 gene expression during folliculogenesis and lutein-

ization in buffalo ovary. Gen. Comp. Endocrinol.; 2011; 173:205-15.
24- Morovvati, H.; Moradi, H.R.; Adibmoradi, M.; Sheybani, M.T. and Salar-Amoli, J.; Wheat sprout effects on histological and histometrical structure and sperm parameters in testis of rat exposed to lead. J. Vet. Res.; 2017; 72(1):87-101.
25- O'donnell, L.; Robertson.; K.M.; Jones, M.E. and Simpson, E.R.; Estrogen and spermatogenesis. Endocr. Rev.; 2001; 22:289-18.
26- Oliveira, N.N.P.M.; Felix, M.A.R.; Pereira, T.C.S.; Rocha, L.G.P.; Miranda, J.R.; Zangeronimo, M.G. et al.; Sperm Quality and Testicular Histomorphometry of Wistar Rats Supplemented with Extract and Fractions of Fruit of Tribulus terrestris L. Braz. Arch. Biol. Technol.; 2015; 58(6):891-97.
27- Pannocchia, M.A.; Borella, M.I.; Camargo, A.C.M.; Gilio, J.M. and Silva C.A.; Effective strategy for fixing the testis of Wistar rats to evaluate the morphological and morphometric parameters of the seminiferous epithelium. Con. Scientiae Saude.; 2008; 7(2):227-33.
28- Patriarca, M.; Menditto, A.; Rossi, B.; Lyon, T.D.B. and Fell, G.S.; Enviornmental exposure to metals of newbors, infants and young children. Microchem. J.; 2000; 67:351-61.
29- Rao, F.; Zhai, Y. and Fei, S.; Punicalagin Mollifies Lead Acetate-Induced Oxidative Imbalance in Male Reproductive System. Int. J. Mol. Sci.; 2016; 17(1269).
30- Restanty, D.A.; Soeharto, S. and Indrawan, I.; The effect of oral lead acetate exposure on bax expression and apoptosis index granulose cells antral follicle in female wistar rat (Rattus norvegicus). Asian Pac. J. Reprod.; 2018; 6(2):54-7.
31- Saleh, A.H.; The Potential Effect of Grape Seeds Extract against Lead toxicity That Induces Infertility to Male Rats. Tikrit j. pure sci.; 2019; 23(1):70-4.
32- Sellandi, T.M.; Thakar, A.B. and Baghel, M.S.; Clinical study of Tribulus terrestris Linn. in oligozoospermia: A double blind study. Clin. Res. J.; 2012; 33(3): 356- 64.
33- Snoeijs, T.; Dauwe, T.; Pinxten, R.; Vandesande, F. and Eens, M.; Heavy metal exposure affects the humoral immune response in a free-living small songbird, the great tit (Parus major). Arch. Environ. Con. Tox.; 2004; 46:399-04.
34- Sudjarwo, S.A.; Sudjarwo, G.W. and Koerniasari.; Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats. Res. Pharm. Sci.; 2017; 12(5):381-90.
35- Suradkar, S.G.; Vihol, P.D.; Patel, J.H.; Ghodasara, B.P.; Prajapati, J. and Prajapati, K.S.; Patho-morphological changes in tissues of wistar rats by exposure of lead acetate. Vet. World; 2010; 3:82-4.
36- Taupeau, C.; Poupon, J.; Nome, F and Lefevre, B.; Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. Reprod. Toxicol.; 2001; 15:385-91.
37- Vallverdu-Coll, Nr.; Mougeot, F.; Ortiz-Santaliestra, M.E.; Castano, C.; Santiago-Moreno, J. and Mateo, R.; Effects of lead exposure on sperm quality and reproductive success in an avian model. Environ. Sci. Technol.; 2016; 50:12484-92.

Vol.15/No.2
Fall-Winter 2021/2022

Iran. J. Vet. Clin. Sci.; 2022; 15(2): 51-58.

Evaluation of the effect of lead acetate on rat sperm parameters during the prenatal and lactation periods

Ehsan Roomiani[1]; Hassan Morovvati[1*]; Javad Sadeghinezhad[2]; Sareh Najaf Asaadi[1]

1. Department of Histology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.
2. Department of Anatomy and Embryology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.

Received: 6 February 2021 ***Accepted:*** 21 August 2021

Summary

The aim of this study was to evaluate the sperm parameters in male Wistar rats exposed to lead acetate during prenatal and lactation periods. In this experimental study, 35 Wistar rats were randomly divided into 7 groups. Rats in the control and sham groups had access to drinking water and a combination of water and glacial acetic acid, respectively. Experimental groups (subgroups of sham) including pre-pregnancy, pregnancy, lactation, pregnancy-lactation and pre-pregnancy-pregnancy-lactation groups had access to 0.2% lead acetate and 0.05% acetic acid in water during the mentioned periods. On day 63 after birth, male offspring were euthanized and sperm samples were taken from the tail of the epididymis and the parameters such as number, survival, chromatin quality, maturity, abnormal shapes and motility were evaluated. Statistically, lead acetate had significant effects on the studied parameters, so that the number, motility (progressive, P; nonprogressive, NP and immobile, IM), viability, sperm maturity, and the occurrence of abnormal sperm forms in the experimental groups showed a significant decrease ($P<0.05$). However, chromatin quality and non-progressive sperm motility did not show significant changes ($P>0.05$). According to the results of the present study, it can be concluded that exposure to lead acetate in the prenatal and lactation periods has significant negative effects on sperm parameters.

Keywords: Lead acetate, Perinatal and lactation periods, Rat, Sperm parameters

***Corresponding Author**: hmorovvati@ut.ac.ir