مطالعه اثرات محافظتی عصاره ریزوم زنجبیل بر آسیب ناشی از استرس گرما در بیضه موش

بهرام عمواوغلی تبریزی[1]، منصور خاکپور[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، استادیار گروه علوم درمانگاهی، تبریز، ایران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، استادیار گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: b_tabrizi@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۲/۷/۱۴ پذیرش نهایی: ۹۲/۱۲/۱۲)

چکیده

عقیمی اختلالی است پیچیده که از لحاظ پزشکی مهم می‌باشد. زنجبیل به‌عنوان یک گیاه دارویی جهت مداوای تعدادی از بیماری‌ها از جمله ضعف قوای جنسی کاربرد دارد. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر عصاره ریزوم زنجبیل بر آسیب ناشی از استرس گرما در بیضه موش می‌باشد. ۴۰ سر موش نر به طور تصادفی در ۴ گروه ۱۰تایی شامل: ۱-شاهد، ۲- استرس گرما، ۳ و ۴- استرس گرما به‌علاوه تیمار با عصاره زنجبیل (۳ mg/animal/day و ۱/۵) تقسیم شدند. بیضه موش‌ها به غیر از گروه شاهد، ۲۰ دقیقه در حمام آب ۴۲ درجه سانتی‌گراد غوطه‌ور گردید. در موش‌های گروه شاهد این کار با دمای آب ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. موش‌ها پس از ۵۰ روز آسان‌کشی شدند. نمونه خون برای سنجش تستوسترون اخذ گردید. از بیضه موش‌ها برای ارزیابی هیستوپاتولوژی و تعیین وضعیت اکسیدانی-آنتی‌اکسیدانی نمونه‌برداری گردید. استرس گرما به طور معنی‌داری تستوسترون خون را کاهش داد و میزان پراکسیداسیون لیپیدی بافت بیضه را افزایش و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز آن را کاهش داد (p<۰/۰۱). عصاره زنجبیل به طور معنی‌داری سطح تستوسترون خون را افزایش داد و میزان مالون‌دی‌آلدئید بیضه را کاهش و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش داد (p<۰/۰۵). آسیب‌شناسی بافتی دژنراسیون پیشرونده‌ای را پس از استرس گرما در بافت بیضه نشان داد. در موش‌های تیمار شده با عصاره زنجبیل ساختار بیضه‌ها و روند اسپرماتوژنز طبیعی بود. نتایج نشان داد که عصاره زنجبیل می‌تواند روند اسپرماتوژنز و آسیب اکسیداتیو بیضه ناشی از استرس گرما را بهبود بخشد.

کلید واژه‌ها: بیضه، عصاره زنجبیل، گرما، موش

مقدمه

ناباروری یک اختلال پیچیده با جنبه‌های پزشکی، روانی و اقتصادی قابل توجهی است (Chandra and Stephen, 1998). حدود ۲۰ درصد از زوج‌ها در عرض یک سال آبستنی را تجربه نمی‌کنند، که ۱۵ درصد از آنها به درمان‌های پزشکی اقدام می‌کنند و کمتر از ۵ درصد این افراد هرگز صاحب فرزند نمی‌شوند. ناباروری هم مردان و هم زنان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. ۵۰ درصد علل ناباروری در زوج‌های بدون فرزند، به مرد مربوط می‌شود (World Health Organization, 2000).

آسیب ناشی از گرما در بیضه‌ها یکی از علل ناباروری در مردان و اغلب پستانداران محسوب می‌شود. قرار گرفتن بیضه‌ها در معرض گرما، حتی کوتاه مدت، منجر به توقف اسپرماتوژنز می‌گردد که آغاز بهبودی در آن حدود ۴۰ یا حتی ۶۰ روز طول می‌کشد. نشان داده شده است که وزن بیضه‌ها حتی ۶۰ روز پس از یکبار قرار گرفتن در معرض گرما، به مقادیر طبیعی بازنگشته است (Setchell, 1998). مکانیسم سلولی که به موجب آن استرس گرما باعث آسیب بافت بیضه می‌شود، به‌طور کامل شناخته نشده است. تحقیقاتی که توسط آیکدا و همکاران انجام شده است، نقش بسیار موثر گونه‌های فعال اکسیژن رادیکال را در آسیب سلول‌های زایای بیضه در اثر استرس گرمایی، نشان داده است (Ikeda *et al*., 1999).

رهیافت‌های مختلف با مکانیسم‌های متفاوتی برای کاهش عوارض ناخواسته استرس گرمایی بر قدرت و توانایی باروری مردان مورد استفاده قرار گرفته است. گزارش‌ها به طور عمده بر استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های با منشا گیاهی متمرکز شده‌اند (Kim *et al*., 2010). در سال‌های اخیر دستیابی به انواع جدید آنتی‌اکسیدان‌ها با منشا گیاهی جهت غلبه بر آسیب‌های ناشی عوامل مختلف به‌طور جدی مورد توجه محققین بوده است (Burns, 2000). طیف وسیعی از گیاهان دارای خواص دارویی بوده و بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، ۷۰ تا ۸۰ درصد جمعیت جهان به طب سنتی برای حفظ سلامتی اعتقاد دارند (World Health Organization, 2002). مصرف گیاهان در درمان نازایی، افزایش قدرت باروری و توانایی جنسی از یک اعتقاد قدیمی و اجدادی برخوردار است (D'Cruz *et al*., 2010).

زنجبیل ساقه زیرزمینی گیاه تازه یا خشک شده *Zingiber officinale* است که از قدیم به عنوان یک گیاه دارویی در طب سنتی کاربرد دارد. این گیاه از شرق آسیا تا نواحی گرمسیری استرالیا گستردگی جغرافیایی دارد. از اثرات مفید زنجبیل در بدن می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی (Kavoli Haghighi and Tooliat, 2002) و پاکسازی رادیکال‌های آزاد (Altman and Marcussen, 2001)، اشاره کرد.

با توجه به اثرات مفید و متعدد درمانی زنجبیل به خصوص اثرات آنتی‌اکسیدانی آن، گمان می‌رود ریزوم این گیاه بتواند بافت بیضه را در برابر آسیب ناشی از استرس گرما محافظت کند. در هر صورت با توجه به بررسی منابع، مطالعه‌ای در رابطه با اثرات محافظتی عصاره ریزوم زنجبیل در برابر آسیب اکسیداتیو بیضه ناشی از استرس گرما یافت نشد. بنابراین، تحقیق حاضر برای اولین بار جهت ارزیابی اثرات محافظتی عصاره

ریزوم زنجبیل در برابر آسیب ناشی از استرس گرما در بیضه موش سوری انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی آزمایشگاهی بوده و در سال ۱۳۹۲ در مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز انجام شد. جامعه آماری این مطالعه شامل موش های سفید نر در محدوده سنی ۷-۶ هفته و با وزن ۳۵-۳۰ گرم بود. در این مطالعه، کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های کار روی حیوانات آزمایشگاهی مورد تائید کمیته نظارت بر حقوق حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز بود.

نمونه‌ای به حجم ۴۰ سر موش از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز تهیه شد. شرایط تغذیه و نگه‌داری برای تمام گروه‌ها یکسان و به صورت ۱۲ ساعت روشنایی/تاریکی و دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد بود. جیره غذایی یکسان و آب نیز به‌طور آزاد در دسترس قرار گرفت. موش‌ها به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی شامل: ۱- گروه شاهد ۲- گروه استرس گرما ۳- گروه استرس گرما + تیمار با دز پایین عصاره زنجبیل ۴- گروه استرس گرما + تیمار با دز بالای عصاره زنجبیل تقسیم شدند.

پودر ریزوم زنجبیل از یک عطاری معتبر در شهر تبریز خریداری شد و پس از تائید توسط گروه فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تبریز مورد استفاده قرار گرفت. عصاره آبی زنجبیل، بر طبق پروتکل ارائه شده توسط WHO تهیه شد (WHO, 1983). پنج گرم از پودر زنجبیل در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر توسط همزن مغناطیسی، به مدت ۱/۵ ساعت مخلوط شد. مخلوط حاصله توسط کاغذ صافی واتمن (whatman) شماره ۱، در دو مرحله صاف شد. فیلترای به دست آمده جمع‌آوری و خشک گردید. قبل از القاء استرس گرما به موش‌های گروه‌های ۳ و ۴ عصاره زنجبیل روزانه به ترتیب به میزان ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم به ازای هر موش به مدت ۱۰ روز گاواژ گردید. سپس موش‌های تمام گروه‌ها توسط تزریق داخل صفاقی داروهای کتامین به میزان ۵۰ mg/kg (Rotexmedica, Germany) و دیازپام به میزان ۵۰ mg/kg (Alfasan, Holland) بیهوش شدند. اسکروتوم موش‌های گروه‌های ۲ تا ۴ (استرس گرما) به مدت ۲۰ دقیقه داخل حمام آب ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در گروه ۱ (گروه شاهد) همین کار با دمای حمام آب ۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد (Abshenas *et al.*, 2011). بلافاصله به موش‌های گروه‌های ۳ و ۴ عصاره زنجبیل به ترتیب با دز ۱/۵ mg/animal/day و ۳ (Verma and Asnani, 2007) گاواژ شد و به مدت ۵۰ روز ادامه یافت. به گروهای ۱ و ۲ نیز همزمان و با حجمی برابر، نرمال سالین گاواژ گردید. در پایان دوره تیمار، هم‌زمان همه موش‌ها با ایجاد جابجایی در مهره‌های گردن به راحتی کشته شدند.

جهت اندازه‌گیری میزان تستوسترون، ۲ میلی‌لیتر از خون تنه جمع‌آوری شده و سرم آن توسط سانتریفیوژ با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جدا شد. میزان تستوسترون خون به روش رادیوایمنواسی (radioimmunoassay, RIA)، توسط کیت RIA (Immunotech, Marseille, France) اندازه‌گیری شد.

برای مطالعه اثرات آنتی‌اکسیدانی، بیضه چپ موش‌ها سریعاً در سالین بسیار سرد (۰/۹ w/v) شستشو و توزین گردید. حدود یک گرم از بافت بیضه توسط هموژنایزر در بافر مناسب بسیار سرد (PBS, pH ۷/۴)، هموژنیزه شده و هموژنات با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و محلول شناور جهت سنجش میزان LPO (Lipid peroxidation) (Buege and Aust, 1984)، SOD (Superoxide dismutase) (Beyer and Fridovich, 1987)، CAT (Catalase) (Aebi, 1984)، GPx (Glutathione peroxidase) (Flohe and Gunzler, 1984) مورد استفاده قرار گرفت.

برای آسیب‌شناسی بافتی، بیضه راست موش‌ها در فرمالین بافری ۱۰ درصد پایدار شد. از نمونه‌های فوق با استفاده از شیوه‌های رایج پاساژ بافت و تهیه مقاطع هیستوپاتولوژی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین تهیه شد. ارزیابی هیستوپاتولوژی بیضه با استفاده از دو شاخص به صورت دو سو بی‌خبر انجام شد. شاخص اول میانگین قطر مجاری اسپرم ساز بیضه بود. ۱۰ عدد از مجاری اسپرم ساز انتخاب و میانگین قطر آنها بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شد. شاخص دوم درصد اسپرماتوژنز بود. حضور اسپرماتوزوا در مجاری اسپرم ساز به عنوان ملاکی برای برقرار بودن اسپرماتوژنز مد نظر قرار گرفت. فقدان اسپرم حتی در حضور اسپرماتوسیت‌های اولیه و ثانویه، به عنوان ملاکی بر اسپرماتوژنز در نظر گرفته نشد (Boran and Ozkan, 2004).

برای تحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۷ استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده کمّی، به صورت انحراف معیار±میانگین (mean±SD) ارائه و اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها توسط آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مورد بررسی قرار گرفت. اختلافات در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شدند. از آزمون آماری کلموگروف- اسمیرنف (Kolmogorov-Smirnov)، نیز برای تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

در موش‌های گروه استرس گرما، سطح تستوسترون سرم در مقایسه با موش‌های گروه شاهد به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) کاهش یافت. در موش‌های گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز بالای عصاره زنجبیل (گروه ۴) در مقایسه با موش‌های گروه استرس گرما بهبود معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در میزان تستوسترون سرم مشاهده شد. در گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز پایین عصاره زنجبیل (گروه ۳) بهبود معنی‌داری در میزان تستوسترون سرم در مقایسه با موش‌های گروه استرس گرما مشاهده نشد. (جدول ۱).

جدول۱- تاثیر عصاره زنجبیل بر سطح سرمی تستوسترون، قطر مجاری اسپرم ساز و درصد اسپرماتوژنز متعاقب استرس گرما در بیضه موش

گروه	فراسنجه		
	تستوسترون سرم (ng/ml)	قطر مجرای اسپرم ساز (µm)	درصد اسپرماتوژنز (٪)
شاهد	۲/۵۹±۰/۵۸	۲۰۹/۳۸±۱۲/۴۸	۹۲/۴۵±۹/۴۸
استرس گرما	۰/۴۹±۰/۱۲*	۱۹۱/۴۳±۷/۶۲*	۷۷/۴۳±۶/۸۵*
استرس گرما به‌علاوه تیمار با عصاره زنجبیل (۱/۵ mg/animal/day)	۰/۶۸±۰/۲۳	۱۹۳/۶۵±۸/۲۵	۸۰/۳۶±۷/۵۲
استرس گرما به‌علاوه تیمار با عصاره زنجبیل (۳ mg/animal/day)	۱/۷۹±۰/۴۵#	۱۹۸/۵۰±۱۰/۶۵#	۸۵/۷۹±۸/۳۵#

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (mean±SD) برای ۱۰ سر موش در هر گروه ارائه شده است. * $p<۰/۰۱$ در مقایسه با گروه شاهد و # $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه استرس گرما.

قطر متوسط لوله‌های اسپرم ساز در بیضه موش‌های گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ مقایسه گردیده است. قطر متوسط لوله‌های اسپرم ساز در بافت بیضه گروه استرس گرما در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۱$). قطر متوسط لوله‌های اسپرم ساز افزایش قابل توجه و معنی‌داری در گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز بالای عصاره زنجبیل نشان داد ($p<۰/۰۵$)، اما بهبود قابل توجهی در متوسط قطر لوله‌های اسپرم ساز موش‌های گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز کم عصاره زنجبیل در مقایسه با موش‌های گروه استرس گرما وجود نداشت.

مقایسه درصد اسپرماتوژنز در بیضه موش‌های گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد اسپرماتوژنز در بیضه موش گروه استرس گرما در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) کاهش یافت. درصد اسپرماتوژنز در موش‌های گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز بالای عصاره زنجبیل به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) افزایش یافت، اما بهبود قابل توجهی در میزان اسپرماتوژنز در موش‌های گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز کم عصاره زنجبیل در مقایسه با موش‌های گروه استرس گرما مشاهده نشد.

در بافت بیضه موش‌های گروه استرس گرما سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA; Malondialdehyde) نسبت به گروه شاهد، به‌طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) بیشتر بود. در موش‌های گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز کم عصاره زنجبیل بهبود قابل توجهی در میزان MDA بافت بیضه مشاهده نشد. عصاره زنجبیل در دوز بالا به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) سطح MDA بافت بیضه را در مقایسه با گروه استرس گرما کاهش داد (جدول ۲).

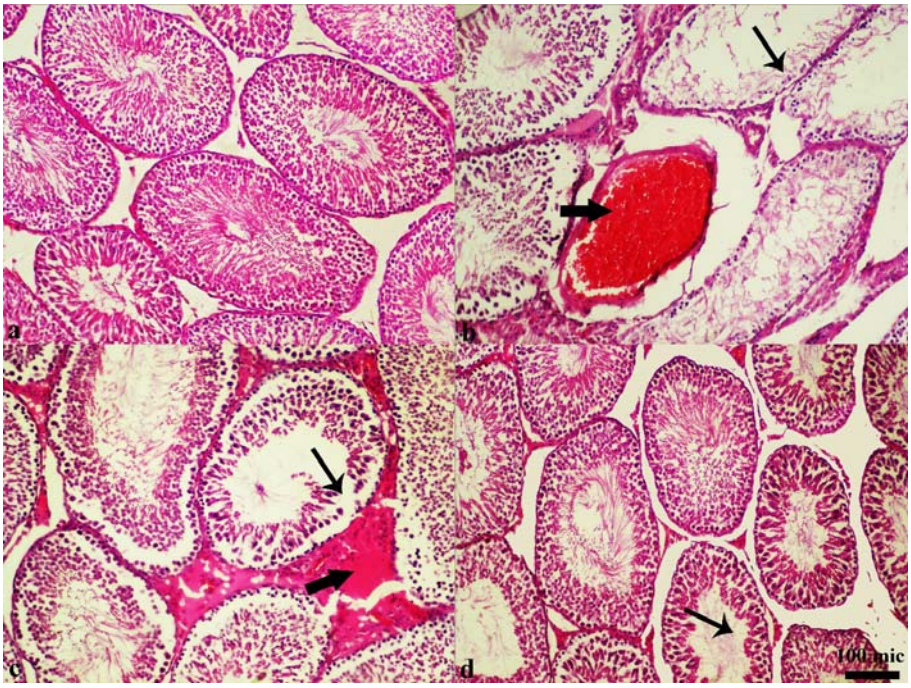
جدول ۲- تاثیر عصاره زنجبیل بر میزان MDA و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز بیضه موش‌ها متعاقب استرس گرما

گروه	فراسنجه			
	مالون‌دی‌آلدئید (nmol/mg protein)	**سوپراکسید دیسموتاز** (U/mg protein)	**کاتالاز** (mmolesH2O2/min/mg protein)	**گلوتاتیون پراکسیداز** (mmolesGSH/min/mg protein)
شاهد	۰/۵۱ ±۰/۰۵	۱/۳۸ ± ۰/۲۱	۳۰/۴۵ ±۲/۶۱	۰/۳۹±۰/۰۶
استرس گرما	۰/۷۸ ±۰/۲۰*	۰/۶۹ ± ۰/۰۶*	۱۷/۲۱±۰/۸۵*	۰/۱۶±۰/۰۳*
استرس گرما به‌علاوه تیمار با عصاره زنجبیل (۱/۵ mg/animal/day)	۰/۷۳ ±۰/۱۶	۰/۸۲ ± ۰/۰۸	۲۰/۲۵ ±۱/۴۵	۰/۱۹±۰/۰۷
استرس گرما به‌علاوه تیمار با عصاره زنجبیل (۳ mg/animal/day)	۰/۶۲ ±۰/۰۶#	۱/۱۳ ± ۰/۱۵#	۲۷/۱۵ ±۱/۹۳#	۰/۲۸±۰/۰۵#

مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (mean±SD) برای ۱۰ سر موش در هر گروه ارائه شده است. * $p<۰/۰۱$ در مقایسه با گروه شاهد و # $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه استرس گرما

فعالیت آنزیم SOD در بیضه موش‌های گروه استرس گرما نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) کمتر بود. به همین ترتیب، فعالیت‌های آنزیم‌های CAT و GPX به طور قابل توجه و معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) در موش‌های گروه استرس گرما در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود. در موش‌های گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز بالای عصاره، درمان باعث بهبود معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مزبور شد. در موش‌های گروه استرس گرما به‌علاوه درمان با دوز کم عصاره زنجبیل بهبود قابل توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیضه در مقایسه با موش‌های گروه استرس گرما مشاهده نشد (جدول ۲).

در مشاهدات هیستوپاتولوژی، بافت بیضه موش‌های گروه شاهد دارای ساختاری طبیعی بود. بافت بیضه موش‌ها در گروه استرس گرما تغییرات دژنراتیو و توقف اسپرماتوژنز را در بسیاری از مجاری اسپرم ساز نشان داد. اتساع فضای میان بافتی با علائمی از ادم و افزایش ضخامت کپسول مشخص بود. در گروه درمان با دوز بالای عصاره زنجبیل بهبود قابل توجهی در آسیب‌های مذکور مشاهده شد و ساختار بافتی بیضه‌ها نزدیک به حالت طبیعی بود. با این حال، در بعضی از مناطق، لوله‌های اسپرم‌ساز کمی چروکیده بودند و غشاء پایه لوله‌ها ظاهر نامنظمی داشتند. ظاهر بافت بینابینی بیضه‌ها در گروه تحت درمان با دوز پایین عصاره شبیه به گروه استرس گرما بود و برخی از لوله‌های اسپرم‌ساز دژنره شده بودند (تصویر ۱).



شکل ۱- نمای ریزبینی بیضه موش (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، درشتنمایی ×۲۵۰). (a) گروه شاهد: نمای ریزبینی ساختار بافتی طبیعی بیضه را نشان می‌دهد. (b) گروه استرس گرما: تغییرات دژنراتیو و نکروز شدید در مجاری اسپرم ساز مشخص است. قسمت اعظم اپیتلیوم پوشاننده مجاری از بین رفته و کاهش ضخامت اپیتلیوم زایا جلب توجه می‌نماید به طوری که در اغلب مناطق تنها یک لایه اسپرماتوگونیوم دیده می‌شود (فلش باریک). پرخونی شدیدی در بافت بینابینی بیضه وجود دارد (فلش ضخیم) و آماس و ادم بینابینی ملایمی نیز قابل مشاهده است. (c) گروه استرس گرما به‌علاوه تیمار با دوز پایین عصاره زنجبیل: اکثر مجاری اسپرم ساز دژنره بوده و کاهش ضخامت لایه‌های زایا در آنها قابل ملاحظه است (فلش باریک). اتساع و وجود ادم همراه با ارتشاح خفیف سلول‌های آماسی در فضای بینابینی مشاهده می‌شود (فلش ضخیم). (d) گروه استرس گرما به‌علاوه تیمار با دوز بالای عصاره زنجبیل: بافت بیضه دارای ساختار بافتی نسبتاً طبیعی می‌باشد ولی فضاهای میان بافتی اندکی متسع بوده و برخی از مجاری اسپرم ساز تغییرات دژنراتیو ملایمی از خود نشان می‌دهند (فلش باریک).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر و گزارش‌های قبلی دلالت بر این دارد که قرار گرفتن کوتاه مدت بیضه موش در معرض گرما می‌تواند تغییرات پاتولوژیک قابل توجهی ایجاد کند (Meistrich *et al.*, 1973). این مطالعه نشان داد که گاواژ عصاره زنجبیل به موش در مدت ۶۰ روز باعث افزایش سطح تستوسترون سرم و بهبود آسیب بیضه ناشی از حرارت در مقایسه با گروه تنش گرما به صورت وابسته به دوز می‌شود. در مطالعه حاضر گاواژ عصاره زنجبیل به موش‌های نر باعث بهبود در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی بافت بیضه شد. در گزارش‌های قبلی نتایج مشابهی از لحاظ ایجاد بهبودی در ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی بافت بیضه توسط زنجبیل در موش صحرایی نر به دست آمده است (Khaki *et al.*, 2009).

یافته‌های هیستوپاتولوژیک در مطالعه حاضر نشان داد که متعاقب استرس گرما بافت بیضه دچار آسیب شده و روند اسپرماتوژنز دچار اختلال می‌گردد. قبلا نشان داده شده است که اسپرماتوسیت‌های پاکیتن (pachytene spermatocytes) و اسپرماتیدهای اولیه (early

spermatids) در بیضه‌ها بسیار به گرما حساس هستند و به سرعت در اثر افزایش دما در بافت بیضه آسیب می‌بینند (Setchell *et al*., 2001). آسیب‌شناسی بافتی در مطالعه حاضر نشان داد که اختلال در اسپرماتوژنز ناشی از استرس گرما را می‌توان با مصرف عصاره زنجبیل به طور نسبی بهبود بخشید.

مطالعات نشان داده‌اند که گرما باعث القاء مرگ سلولی در بیضه‌ها می‌شود (Babaei *et al*., 2007). بررسی‌های انجام شده توسط خان و براون در سال ۲۰۰۲ مشخص کرده است که مرگ سلول‌های بیضه در اثر گرما بیشتر در اسپرماتوسیت‌های اولیه میوتیک و اسپرماتوگونی میتوتیک ایجاد می‌شود (Khan and Brown, 2002). آلان و همکاران مدعی هستند که مرگ سلولی در بیضه در اثر گرما به طور عمده بر اثر نکروز اتفاق می‌افتد نه به دلیل آپوپتوز، هرچند که این آسیب با التهاب همراه نمی‌باشد (Allan *et al*., 1987). با این حال، مطالعات بعدی نشان داده‌اند که آپوپتوز در این میان موثرتر می‌باشد (Lue *et al*., 2000). در کل، به نظر می‌رسد مکانیسم مرگ سلول‌های بیضه در اثر استرس گرما مربوط به آپوپتوز باشد نه نکروز و ممکن است در اثر فعالیت گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS)، پروتئین سرکوب کننده تومور P53، آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS)، انتقال عامل پیش‌آپوپتوتیک Bax از سیتوپلاسم به یک موقعیت دور هسته و رها شدن سیتوکروم C و تعدادی از کاسپازها از میتوکندری باشد (Setchell, 2006).

در بررسی حاضر افزایش سطح MDA در بیضه موش متعاقب حرارت اسکروتوم نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو توسط رادیکال‌های آزاد یکی از مکانیسم‌های ممکن در پاتوفیزیولوژی آسیب ناشی از گرما در بیضه است. ایشی و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داده‌اند که تخلیه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از بدن موش‌ها باعث شده است که این موش‌ها نسبت به آسیب ناشی از افزایش دما در بیضه‌ها بسیار حساس‌تر باشند (Ishii *et al*., 2005). تحقیقات نشان داده است که غشای پلاسمایی اسپرم حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع است که باعث حساسیت ویژه آن به آسیب پراکسیداتیو می‌شود. پراکسیداسیون لیپیدی ساختار ماتریکس لیپیدی را در غشاهای اسپرماتوزوا تخریب می‌کند که با فقدان تحرک و نقص در تمامیت غشا سلول همراه است (de Lamirande *et al*., 1997; Sonmez *et al*., 2005).

در مطالعه ما، مصرف زنجبیل باعث کاهش میزان MDA بیضه شده است که نشان می‌دهد مصرف زنجبیل باعث کنترل و بهبود وضعیت اکسیدانی-آنتی‌اکسیدانی بیضه شده است. همچنین نتایج بررسی‌های ما نشان داد که درمان با زنجبیل به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیضه را در موش‌های واقع در معرض استرس گرمایی کیسه بیضه (اسکروتوم)، بهبود می‌بخشد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش مقدار MDA بافت بیضه در موش‌های درمان شده با زنجبیل که در معرض استرس گرمایی اسکروتوم بوده‌اند، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد پراکسیداسیون لیپیدی زنجبیل را تایید می‌کند. بنابراین، توضیح دیگر برای بهبود آسیب بیضه در موش‌های تحت استرس گرمایی کیسه بیضه که با زنجبیل درمان شده‌اند، کاهش سطح MDA بیضه و مرمت فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی آن می‌باشد.

با توجه به اینکه زمان مورد نیاز برای شروع تقسیم سلول‌های بنیادی تا شکل‌گیری اسپرم در موش حدود ۳۵ روز است (de Rooij and Russell, 2000)، بنابراین، دوره زمانی انتخاب شده در مطالعه حاضر برای پایش بر روند بهبود اسپرماتوژنز توسط اسپرماتوگونی‌های بازمانده در هر دو گروه استرس گرما و تیمار با زنجبیل کافی بوده است. با توجه به گزارش ستچل در سال ۱۹۹۸، بهبود در اسپرماتوژنز، حدود ۴۰ روز پس از قرار گرفتن در معرض گرما ایجاد می‌شود (Setchell, 1998)، اما یافته‌های ما نشان داد که بیش از ۵۰ روز به بهبودی کامل نیاز است و درمان با زنجبیل قادر به کاهش مدت زمان بهبودی است.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره ریزوم زنجبیل باعث بهبود آسیب بافت بیضه ناشی از استرس گرما در موش می‌شود، که اثرات مفید فوق را می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی آن و توانایی در پاکسازی رادیکال‌های آزاد نسبت داد. بنابراین، استفاده از زنجبیل در موارد آسیب بیضه ناشی از استرس گرما پیشنهاد می‌شود. تعیین اثرات سمی مصرف دراز مدت عصاره ریزوم زنجبیل و اثرات محافظتی آن در دوزهای مختلف نیاز به مطالعات آتی دارد.

سپاسگزاری

این مقاله از طرح تحقیقاتی که با بودجه پژوهشی و حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به انجام رسیده است، استخراج شده است. بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Abshenas, J., Babaei, H., Zare, M.H., Allahbakhshi, A. and Sharififar F. (2011). The effects of green tea (*Camellia sinensis*) extract on mouse semen quality after scrotal heat stress. Veterinary Research Forum, 2(4): 242-247.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105: 121-126.
- Allan, D.J., Harmon, B.V. and Kerr, J.F.R. (1987). Cell death in spermatogenesis. In: Perspectives on mammalian cell death. Potten, C.S. editor. UK: Oxford University Press, pp: 229-258.
- Altman, R.D. and Marcussen, K.C. (2001). Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. Arthritis and Rheumatism, 44(11): 2531-2538.
- Babaei, H., Derakhshanfar, A., Kheradmand, A. and Bazy, J. (2007). Zinc modulates heat-induced degenerative effects in mice testes. Iranian Journal of Veterinary Research, 8(4): 298-303.
- Beyer, W.E. and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Analytical Biochemistry, 161(2): 559-566.
- Boran, C. and Ozkan, K.U. (2004). The effect of zinc therapy on damaged testis in prepubertal rats. Pediatric Surgery International, 20(6): 444-448.
- Buege, J.A. and Aust, S.D. (2000). Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, 1984; 105: 302-310.
- Burns, M.M. (2000). Alternative medicine: Herbal preparation. Clinical Pediatric Emergency Medicine, 1(2): 186-190.
- Chandra, A. and Stephen, E.H. (1998). Impaired fecundity in the United States: 1982-1995. Family Planning Perspectives, 30(1): 34-42.

- D'Cruz, S.C., Vaithinathan, S., Jubendradass, R. and Mathur, P.P. (2010). Effects of plants and plant products on the testis. Asian Journal of Andrology, 12(4): 468-479.
- de Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. and Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of Reproduction, 2(1): 48-54.
- de Rooij, D.G. and Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. Journal of Andrology, 21(6): 776-798.
- Flohe, L. and Gunzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. Methods in Enzymology, 105: 114-121.
- Ikeda, M., Kodama, H., Fukuda, J., Shimizu, Y., Murata, M., Kumagai, J., *et al*. (1999). Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. Biology of Reproduction, 61(2): 393-399.
- Ishii, T., Matsuki, S., Iuchi, Y., Okada, F., Toyosaki, S., Tomita, Y., *et al*. (2005). Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. Free Radical Research, 39(7): 697-705.
- Kavoli Haghighi, M. and Tooliat, T. (2002). Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Journal of Medicinal Plants Research, 1(1): 19-28.
- Khaki, A., Fathiazad, F., Nouri, M., Khaki, A.A., Ozanci, C.C., Ghafari-Novin, M., *et al*. (2009). The effects of Ginger on spermatogenesis and spermparameters of rat. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 7(1): 7-12.
- Khan, V.R. and Brown, I.R. (2002). The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, and thymus of the adult and developing rat. Cell Stress Chaperon, 7(1): 73-90.
- Kim, Y.H., Kim, G.H., Shin, J.H., Kim, K.S. and Lim, J.S. (2010). Effect of Korea Red Ginseng on Testicular Tissue Injury after Testicular Torsion and Detorsion. Korean Journal of Urology, 51(11): 794-799.
- Lue, Y., Sinha Hikim, A.P., Wang, C., Im, M., Leung, A. and Swerdloff, R.S. (2000). Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the “two-hit” approach to male contraceptive development. Endocrinology, 141(4): 414-424.
- Meistrich, M., Eng, V. and Loir, M. (1973). Temperature effects on the kinetics of spermatogenesis in the mouse. Cell Proliferation, 6(4): 379-393.
- Setchell, B.P., Ploen, L. and Ritzen, E. (2001). Reduction of long term effects of local heating of the testis by treatment of Rats with a GnRH agonist and an antiandrogen. Reproduction, 122: 255-263.
- Setchell, B.P. (2006). The effects of heat on the testes of mammals. Animal Reproduction Science, 3(2): 81-91.
- Setchell, B.P. (1998). The parkes lecture: heat and the testis. Journal of Reproduction and Fertility, 114(2): 179-194.
- Sonmez, M., Turk, G. and Yuce, A. (2005). The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. Theriogenology, 63(7): 2063-2072.
- Verma, R.J. and Asnani, V. (2007). Ginger extract ameliorates Paraben induced biochemical changes in liver and kidney of mice. Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research, 64(3): 217-220.
- WHO Protocol CG-06. (1983). APJF/IP 1001A, World Health Organisation: Geneva.
- World Health Organization. (2000). WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press.
- World Health Organization. (2002). Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva.

Protective effects of ginger (*Zingiber officinale*) rhizome extract on heat-induced testicular damage in the mouse

Amouoghli Tabrizi, B.[1*], Khakpour, M.[2]

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author email: b_tabrizi@iaut.ac.ir
(Received: 2013/10/6 Accepted: 2014/3/3)

Abstract

Infertility is a complicated problem with medical significance. Ginger as a medicinal herb is used to treat a number of diseases such as sexual weakness. The aim of this study was to evaluate the effects of ginger rhizome extract on heat-induced testicular damage in the mouse. Fourty male mice were randomly divided into 4 equal groups including: 1- Control, 2- heat stressed, 3 and 4- stressed and treated with ginger extract (1/5 and 3 mg/animal/day). The scrotum of experimental mice was immersed for 20 min in a water bath at 42°C. Control mice were similarly treated except that the water bath was maintained at 23°C. Mice were euthanized after 50 days. Blood samples were collected for analysis of testosterone levels. Testes were removed for histopathological assessment and oxidant/antioxidant status. Heat stress significantly reduced blood testosterone level and increased lipid peroxidation product and decreased antioxidant activities of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase ($p<0.01$). Ginger extract significantly increased blood testosterone level and decreased testis malondialdehyde level and increased antioxidant enzymes activities ($p<0.05$). Histopathological observations showed progressive degeneration after heating. In the mice treated with ginger extract, testes had normal spermatogenesis and structure. The results indicated that ginger extract improves spermatogenesis and oxidative damage of testis induced by heat stress in the mouse.

Key words: Ginger extract, Heating, Mice, Testis