فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد۱۵- شماره ۳- پاییز۱۳۹۹

مقاله تحقیقی

بررسی اثر عصاره زیرفون (*Tilia platyphyllos* L.) بر پارامترهای اسپرمی بیضه القاء شده توسط واریکوسل در موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار

ریحانه محبعلی [۱]، اکرم عیدی [۲،*]، پژمان مرتضوی [۳]، محمد امین عدالت منش [۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* **مسئول مکاتبات:** پست الکترونیکی: akram_eidi@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۵/۳ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۶/۲۱

چکیده

دستگاه تولید مثلی مردان مبتلا به واریکوسل، از طریق اثرات منفی ناشی از استرس اکسیداتیو در بیضه قرار می گیرد. در طب سنتی گیاه زیرفون (*Tilia platyphyllos* L.) به عنوان یک دارویی در درمان زخم معده، اسپاسم و آرام بخش استفاده می شود. ترکیبات شیمیایی همانند ترپنوئیدها و فلاونوئیدها در گیاه زیرفون شناسایی شده است. هدف بررسی اثر عصاره گیاه زیرفون بر پارامترهای اسپرم در موش های صحرایی سالم و واریکوسلی می باشد. در این تحقیق ۴۸ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی در ۸ گروه تقسیم شدند: کنترل سالم، گروه های تجربی سالم دریافت کننده عصاره زیرفون (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت خوراکی، روزانه)، گروه کنترل نابارور (جراحی واریکوسل)، گروه های تجربی نابارور همراه با عصاره زیرفون (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دریافت خوراکی، روزانه). پس از ۶۰ روز آنالیز اسپرم انجام شد و داده ها با آنالیز واریانس یک عاملی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که آنالیز اسپرم به صورت معناداری در حیوانات کنترل نابارور در مقایسه با کنترل سالم کاهش یافته است. تیمار زیرفون مانع آسیب به اسپرم جلوگیری کرده و سبب افزایش معناداری در پارامترهای اسپرم حیوانات نابارور شد و آسیب های واریکوسلی را کاهش داده و از ساختار طبیعی بیضه محافظت کرد. به نظر می رسد زیرفون به عنوان عامل آنتی اکسیدانی در برابر آسیب های القاء واریکوسل در موش صحرایی عمل می کند.

واژه های کلیدی: زیرفون، واریکوسل، بیضه، موش صحرایی

مقدمه

دستگاه تناسلی در مردان مسئول تولید، بلوغ و انتقال اسپرم است که هر گونه ناهنجاری ساختاری و مولکولی در این دستگاه تولیدمثلی، موجب ناباروری مردان می‌شود (۲). یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های ساختاری دستگاه تناسلی در مردان که اتساع و پیچش غیرطبیعی وریدهای طناب اسپرماتیک بیضه را شامل می‌شود، واریکوسل نامیده می‌شود (۳). شیوع واریکوسل در جمعیت عمومی مردان حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد بوده، درحالی که در زوج‌های نابارور که دلیل ناباروری آن ها فاکتورهای مردانه است .حدود ۲۵ تا ۴۰ درصد و در مردان با ناباروری ثانویه به حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد می‌رسد. این امر نشان‌دهنده این است که

مردانی که در ابتدا بارور بودند، ممکن است با واسطه واریکوسل نابارور شوند (۴).

ناباروری می‌تواند در روند اسپرماتوژنز که یک روند پیچیده در لوله‌های منی‌ساز بیضه است، اختلال ایجاد کند. در این فرایند، ابتدا سلول‌های اسپرماتوگونی با تقسیم میتوز سلول‌های اسپرماتوسیت اولیه را ایجاد می‌کنند. سپس اسپرماتوسیت‌های اولیه با تقسیم میوز ۱ اسپرماتوسیت‌های ثانویه را ایجاد می‌کند. توسط تقسیم میوز ۲ اسپرماتیدها از اسپرماتوسیت‌های ثانویه ایجاد می‌شوند. نهایتا این اسپرماتیدها توسط روند اسپرمیوژنز به اسپرماتوزوآی بالغ تبدیل می‌شوند که به داخل حفره داخلی لوله منی‌ساز آزاد می‌شود (۵). عدم توانایی در تولید تعداد کافی اسپرماتوزوآی سالم از شایعترین علل ناباروری مردان است (۶). در بیماران واریکوسل عملکرد بیضه بطور پیشرونده آسیب می‌بیند و مکانیسم‌های پاتولوژیکی پیشنهادی برای افراد مبتلا به واریکوسل شامل هیپوکسی بیضه، اتساع وریدها، افزایش دمای بیضه (ناشی از برگشت خون)، افزایش استرس اکسیداتیو و غیره می‌باشد (۴). همچنین، مطالعات متعدد نشان دادند که در بیماران واریکوسلی وریدهای ناحیه بیضه گشاد می‌شوند و به همین دلیل جریان خون در رگ‌ها کاهش می‌یابد. با کاهش فشار خون، حرارت بیضه افزایش می‌یابد و کیفیت پارامترهای اسپرمی (تعداد، تحرک، مورفولوژی و زنده‌مانی) نسبت به افراد بارور کاهش یافته و ناباروری ایجاد می‌شود (۷).

واریکوسلکتومی رایج‌ترین روش درمان ناباروری ناشی از واریکوسل است و دمای اسکروتوم را در مردان نابارور کاهش می‌دهد (۸). در واریکوسلکتومی نشان داده شده است که غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها از قبیل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و ویتامین C در پلاسمای منی و در جهت بهبود کیفیت اسپرم افزایش می‌یابد (۹). با توجه به عوارض این روش که شامل ایجاد هیدروسل (آب‌آوردگی بیضه) و آتروفی بیضه است، ضرورت درمان ناباروری با عارضه واریکوسل نیاز به روش‌های درمانی جدید و غیرتهاجمی را مطرح ساخته و آن استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند در درمان این گونه بیماران موثر واقع شود. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیبات با موادی بوده که باعث خنثی‌کردن و سرکوب تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن و یا ممانعت از اعمال آنها می‌شوند (۵). با این حال، درمان آنتی‌اکسیدانی نیز به عنوان یک روش جدید می‌تواند به جای روش جراحی واریکوسلکتومی در نظر گرفته شود. اخیرا مطالعاتی با هدف درمان جایگزین برای بهبود شرایط واریکوسل انجام شده است. این مطالعات اثرات مثبت قابل توجه داروها و عصاره‌های گیاهی در مدیریت ناباروری مردان مبتلا به واریکوسل را اثبات کرده‌اند (۸).

گیاه زیرفون با نام علمی (*Tilia platyphyllos*) و نام اروپایی آن Lime tree و Linden tree و نام ایرانی آن زیرفون می‌باشد. درختی از تیره پنیرکیان (Malvaceae) راسته پنیرک‌سانان (Malvales) است. بیشتر در جنگل‌های نیمکره شمالی در اروپا، آسیا، مرکز و شرق شمال امریکا می‌باشد (۱۰). گیاه زیرفون بر مبنای طب سنتی ایران، دارای طبیعتی گرم و خشک بوده و به عنوان گیاهی برای سم‌زدایی بدن معرفی کرده‌اند. همچنین، از نظر خواص دارویی و درمانی طی تحقیقاتی که انجام شده، دارای اثرات آرام‌بخشی، اشتهاآور، مدر (۱۱)، ضداسپاسم، خلط‌آور، درمان میگرن و سرفه (۱۲) و همچنین دارای اثرات موثری در بی‌خوابی، روماتیسم (۱۳) می‌باشد. مواد موثره در گل زیرفون از جمله فلاونوئیدها سبب کاهش خطر ابتلا به اختلال‌های مختلف از جمله سرطان و بیماری‌های قلبی-عروقی می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدتوموری در گیاهانی از جمله گیاه زیرفون دیده می‌شود (۱۴). گل زیرفون به دلیل داشتن مواد موثره از جمله فلاونوئیدها به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند. مطالعات بیوشیمیایی نشان می‌دهد که گیاه زیرفون دارای ترکیب‌های شیمیایی از قبیل فلاونوئیدهای اصلی گل، ایزوکوئرستین-روتین و آستراگالین و فلاونوییدهای اصلی برگ، کوئرستین-۳-۷- دی‌رامنوزید و کامپفرول-۳-۷ دی‌رامنوزید هستند. همچنین، گل زیرفون حاوی موسیلاژ، p- کوماریک اسید، کامپفرول، ترپنویی، کوئرستین و روغن‌های فرار مانند سیترال، سترونلول، ائوژنول و لیمونن است. اما با این وجود، آگاهی از سهم بالقوه تفاوت در الگوی فلاونوئید بین گل‌آذین و برگ زیرفون در خواص درمانی آن ناشناخته است (۱۵). در تحقیق حاضر اثر تیمار عصاره گیاه زیرفون بر آنالیز اسپرم در موش‌های نابارور القاء شده توسط واریکوسل بررسی شد.

مواد و روش ها

آماده سازی عصاره

در پژوهش تجربی حاضر، برگ گیاه زیرفون از عطاری خریداری شد و سپس آسیاب گردید و به صورت پودر تهیه شد. حاصله با استفاده از اتانول ۸۰ درصد عصاره-گیری شد و محصول حاصله توسط روتاری (Rotary) تغلیظ گردید.

حیوانات آزمایشگاهی

تعداد ۴۸ سر موش های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن حدود ۲۵۰-۲۲۰ گرم از انیستوپاستور خریداری گردید و در شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲±۲۳ درجه سانتیگراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا) نگهداری شدند.

القای واریکوسل در حیوانات

برای القاء واریکوسل در بیضه چپ موش‌های صحرایی نر از روش ترنر (Turner) استفاده شد (۱۶). بیهوشی با تزریق داخل‌صفاقی مخلوط کتامین ۱۰ درصد (مرک، آلمان) و با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلازین ۲ درصد (مرک، آلمان) و با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انجام شد و موش ها به پشت قرار داده شده و یک برش میدلاین عمودی در شکم در حدود ۴-۳ سانتی متر ایجاد شد. پس از مشاهده ورید کلیوی چپ و محل ورود ورید اسپرماتیک داخلی به آن، به آرامی اطراف آن آزاد گردید و یک آنژیوکت شماره ۲۰ به موازات ورید قرار داده شد و با نخ بخیه سیلک ۴-۰ روی ورید کلیوی چپ گره زده شد. طبق متد Koksal قطر ورید کلیه چپ حدود ۵۰٪ کاهش خواهد داد. سپس محل برش با نخ بخیه ۳-۰ در دو لایه (عضله و پوست) بخیه زده شد.

گروه‌های مورد مطالعه

موش‌ها در ۸ گروه ۶ تایی: کنترل سالم، کنترل نابارور (جراحی واریکوسل)، گروه‌های تجربی سالم و گروه‌های تجربی نابارور دسته‌بندی شدند.

گروه کنترل سالم که فقط آب و غذا دریافت کردند.

گروه کنترل نابارور تحت عمل واریکوسل قرار گرفتند و هیچگونه تیماری دریافت نکردند.

گروه‌های تجربی سالم، عصاره اتانولی گیاه زیرفون را در دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش به صورت گاواژ (در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر) روزانه دریافت کردند.

گروه‌های تجربی نابارور، علاوه بر القاء واریکوسل، عصاره گیاه زیرفون با دوز ۵۰، ۱۰۰ و۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن موش به صورت گاواژ (در حجم ۰/۵ میلی-لیتر) روزانه دریافت کردند. مدت تیمار ۶۰ روز بود.

مطالعات اسپرمی

پس از پایان دوره آزمایش، در آخرین روز موش‌ها برای مدت ۱۲ ساعت ناشتا نگه داشته شده و سپس به وسیله اتر بیهوش شدند. پس از بیهوشی، بیضه‌ها و اپیدیدیم چپ موش‌های صحرایی نر از بدن خارج گردید و مشاهده شد که بیضه موش‌های واریکوسلی آتروفیه (کوچک شدن) شدند. سپس بافت اپیدیدیم را در نرمال سالین شستشو داده تا عاری از خون گردد. سر اپیدیدیم از بیضه جدا شد و داخل میکروتیوپی که حاوی محیط کشت Ham's F_{10} بود به مدت ۱۰ دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت. پس از خروج اسپرم‌ها، ۱۰میکرولیتر از محلول حاصله را با استفاده از سمپلر برداشته و توسط میکروسکوپ نوری با لام نئوبار تعداد، تحرک، مورفولوژی و درصد زنده‌مانی اسپرم ها شمارش گردید.

روش بررسی تعداد اسپرم

پس از همگن کردن محلول داخل میکروتیوپ توسط سمپلر یک قطره از محلول روی لام نئوبار قرار گرفت و در ۹ عدد خانه موجود در مرکز لام، تعداد اسپرم‌هایی که روی خط مربع لام یا داخل مربع لام قرار داشت، شمارش گردید. تعداد به دست آمده در 10^6 ضرب گردید و تعداد اسپرم‌ها محاسبه شد.

روش بررسی درصد تحرک اسپرم

به این منظور، تحرک صد اسپرم در پنج میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰ بررسی شد و میانگین آنها به عنوان درصد تحرک اسپرم‌ها ثبت شد که بر اساس طبقه‌بندی جدید WHO به چهار گروه تقسیم شدند (۱۷)

A (حرکت پیش‌رونده‌ی سریع در مسیر مستقیم) B (حرکت پیش‌رونده‌ی آرام در مسیر مستقیم یا غیرمستقیم) C (حرکت در جا) D (بدون حرکت).

روش بررسی مورفولوژی اسپرم

مورفولوژی صد اسپرم در پنج میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی ۴۰ بررسی شد و میانگین آنها به عنوان درصد مورفولوژی اسپرم‌ها ثبت شد. اسپرم‌هایی که سر غیرعصایی و دم تک‌رشته ای نبودند، جز اسپرم‌های غیرنرمال محاسبه شد.

روش بررسی درصد زنده‌مانی اسپرم

برای به‌دست آوردن درصد زنده‌مانی اسپرم، ۵-۶ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپرم را روی لام مورد مطالعه گذاشته و با یک قطره‌ی کوچک از ائوزین نگروزین رنگ-آمیزی گردید. از آن جایی که اسپرم‌های زنده، رنگ ائوزین نگروزین را جذب نکرده و اسپرم های مرده با جذب آن به رنگ صورتی تا قرمز در آمدند، با شمارش تعداد ۱۰۰ اسپرم در بزرگنمایی ۱۰۰، درصد اسپرم‌های زنده به دست آورده شد.

آنالیز آماری

داده های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS-20 و توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way ANOVA و پس آزمون توکی (Tukey) بررسی گردید. نتایج به صورت میانگین± انحراف از معیار ارائه گردید. ملاک استنتاج آماری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تیمار عصاره گیاه زیرفون در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تغییر معناداری بر تعداد اسپرم سالم، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم در اپیدیدم موش‌های سالم در مقایسه با کنترل سالم ایجاد ننموده است. نتایج تحقیق نشان داد که میزان اسپرم‌ها در تعداد، مورفولوژی و زنده‌مانی در حیوانات کنترل واریکوسل شده در مقایسه با کنترل سالم کاهش معناداری ($p<۰/۰۰۱$) نموده است. نتایج تیمار عصاره گیاه زیرفون در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر تعداد، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم-ها در مقایسه با کنترل واریکوسل افزایش معناداری ($p<۰/۰۰۱$ ، $p<۰/۰۱$ و $p<۰/۰۵$) نموده است (جدول ۱).

همچنین، نتایج نشان داد که تحرک اسپرم‌های موش سالم در مقایسه با کنترل سالم تغییر معناداری ننموده است، ولی در گروه کنترل واریکوسل در مقایسه با کنترل سالم کاهش معناداری ($p<۰/۰۰۱$، $p<۰/۰۱$) نموده است. نتایج تیمار عصاره گیاه زیرفون در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بر تحرک اسپرم‌ها در مقایسه با کنترل واریکوسل افزایش معناداری ($p<۰/۰۰۱$، $p<۰/۰۵$) نموده است (جدول ۲).

جدول ۱ - بررسی آنالیز اسپرم ها (تعداد اسپم های سالم و غیر نرمال، زنده مانی اسپرم) در ۸ گروه تجربی

گروه ها	تعداد اسپرم های سالم (×۱۰^۶)	تعداد اسپرم های زنده (×۱۰^۶)	تعداد اسپرم های بدون سر عصایی (×۱۰^۶)	تعداد اسپرم های بدون دم (×۱۰^۶)	تعداد اسپرم های گردن خمیده (×۱۰^۶)
گروه ۱ (کنترل سالم)	۷۰/۴ ± ۱/۱۷	۸۷/۸۳ ± ۱/۳۵	۰/۵۷ ± ۰/۱۰	۱/۰۰ ± ۰/۰۳	۰/۸۳ ± ۰/۱۷
گروه ۲ (تجربی سالم با عصاره ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم)	۶۸/۵ ± ۲/۰۶	۸۵/۳۳ ± ۱/۴۵	۱/۳۳ ± ۰/۳۳	۱/۲۵ ± ۰/۱۷	۱/۲۵ ± ۰/۱۲
گروه ۳ (تجربی سالم با عصاره ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم)	۶۷/۳ ± ۰/۶۷	۸۵/۶۶ ± ۱/۷۴	۰/۴۰ ± ۰/۰۵	۲/۳۳ ± ۰/۳۳	۱/۶۶ ± ۰/۱۳
گروه ۴ (تجربی سالم با عصاره ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم)	۷۲/۰ ± ۳/۷۹	۸۶/۸۳ ± ۱/۴۴	۱/۰ ± ۰/۱۵	۰/۶۶ ± ۰/۱۳	۱/۶۷ ± ۰/۱۶

گروه ۵ (واریکوسل)	۰/۵۸ ± ۳/۰ ***	۱/۰۵ ± ۲۳/۳۳ ***	۰/۳۳ ± ۳/۷ ***	۰/۵۸ ± ۶/۰۵ ***	۱/۱۵ ± ۸/۱۰ ***
گروه ۶ (واریکوسل با عصاره ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۸۸ ± ۵/۷ ***	۱/۵۴ ± ۲۹/۳۳ ***	۰/۵۸ ± ۳/۰ **	۰/۸۹ ± ۴/۰۶ ***	۱/۰۸ ± ۷/۸۵ **
گروه ۷ (واریکوسل با عصاره ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم)	۱/۲۰ ± ۱۹/۳ *** +++	۱/۶۲ ± ۶۳/۱۶ *** +++	۰/۱۳ ± ۱/۶۷ +	۰/۱۲ ± ۳/۳۲ *+	۰/۱۵ ± ۲/۲۰ +
گروه ۸ (واریکوسل با عصاره ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم)	۲/۹ ± ۶۲/۰ ** +++	۱/۶۴ ± ۶۹/۱۶ *** +++	۰/۱۷ ± ۱/۲۵ ++	۰/۱۴ ± ۲/۳۴ ++	۰/۱۲ ± ۱/۶۱ +

$p<0.05$ * و $p<0.001$ *** تفاوت معنی داری با گروه کنترل سالم

$p<0.05$+ ، $p<0.01$ ++ ، $p<0.001$ +++ تفاوت معنی داری با گروه کنترل واریکوسل

جدول ۲ - بررسی آنالیز اسپرم ها (تحرک اسپرم) در ۸ گروه تجربی.

گروه ها	تعداد اسپرم های بی حرکت و ثابت ($\times10^6$)	تعداد اسپرم ها با حرکت شلاقی($\times10^6$)	تعداد اسپرم ها با حرکت جلورونده ($\times10^6$)	تعداد اسپرم ها با حرکت درجا ($\times10^6$)
گروه ا (کنترل سالم)	۰/۲۶ ± ۳/۱۰	۰/۳۸ ± ۳۵/۲۱	۰/۴۵ ± ۲۶/۱۱	۰/۵۷ ± ۹/۰۵
گروه ۲ (تجربی سالم با عصاره ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۴ ± ۳/۵۱	۰/۹۱ ± ۳۲/۰۵	۱/۴۴ ± ۲۷/۵۰	۰/۴۱ ± ۸/۱۱
گروه ۳ (تجربی سالم با عصاره ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۹ ± ۳/۶۶	۳/۶۱ ± ۳۴/۲۵	۰/۵۲ ± ۲۵/۶۱	۰/۵۷ ± ۱۰/۲۴
گروه ۴ (تجربی سالم با عصاره ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۵ ± ۳/۰۵	۱/۴۵ ± ۳۴/۶۵	۱/۲۸ ± ۲۸ /۰۷	۱/۲۰ ± ۱۰/۳۲
گروه ۵ (واریکوسل)	۰/۸۸ ± ۱۱/۶۶ ***	۰/۰۸ ± ۰/۵۱ ***	۰/۱۴ ± ۲/۶۵ ***	۰/۱۵ ± ۳/۰۷ **
گروه ۶ (واریکوسل با عصاره ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۳۲ ± ۹/۵۶ ***	۰/۰۵ ± ۱/۶۶ ***	۰/۱۷ ± ۵/۳۱ ***	۱/۴۵ ± ۶/۲۳
گروه ۷ (واریکوسل با عصاره ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۳ ± ۳/۳۴ +++	۰/۲۱ ± ۸/۳۳ *** +++	۱/۲۰ ± ۱/۴۲ *** +++	۰/۸۸ ± ۸/۳۲ +
گروه ۸ (واریکوسل با عصاره ۰/۲ میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۱۶ ± ۱/۱۳ +++	۱/۳۵ ± ۳۳/۱۴ *** +++	۱/۰۲ ± ۲۷/۶۴ +++	۰/۶۷ ± ۷/۵۲ +

$p<0.05$ * و $p<0.001$ *** تفاوت معنی داری با گروه کنترل سالم

$p<0.05$+ و $p<0.01$ ++ و $p<0.001$ +++ تفاوت معنی داری با گروه کنترل واریکوسل

بحث

در سال‌های اخیر، توجه چشمگیری به داروهای گیاهی در مباحث جهانی سلامت و بهداشت شده است. استفاده از گیاهان دارویی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به سرعت در حال افزایش است. تاکنون تحقیقات بسیاری با استفاده از عصاره‌های گیاهی مختلف بر روی پارامترهای بیضه و اپیدیدیم انجام شده است که در نهایت سبب افزایش تعداد اسپرم، افزایش تحرک و مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم شده است و بر اسپرماتوژنز تاثیر بسزایی داشته اند. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گیاه زیرفون منجر به تغییرات روند اسپرماتوژنز در گروه‌های واریکوسلی شده است و باعث افزایش تعداد، مورفولوژی، تحرک و زنده‌مانی اسپرم‌ها گردید. ناباروری مردان در ارتباط با واریکوسل موجب ایجاد اختلال در روند اسپرماتوژنز می‌گردد که در نهایت به کاهش قابل‌توجهی در تعداد، تحرک و زنده‌ماندن اسپرم منجر می‌شود (۱۸). در مطالعه انجام شده، واریکوسل تجربی در موش‌های صحرایی نر در مقایسه با گروه کنترل سالم موجب کاهش معنادار در تعداد، تحرک، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم گردید. تغییر کیفیت مایع منی اغلب در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل دیده شده است. به طور خاص، کاهش تعداد و تحرک اسپرم و اختلال در مورفولوژی اسپرم‌ها امری عادی در واریکوسل گزارش شده است و این یافته‌ها اغلب در ارتباط با کاهش تدریجی و اشکال غیرمعمول اسپرماتوزوآ هستند. در مطالعه مشابه، گزارش شده است که واریکوسل موجب کاهش تعداد اسپرم، تحرک ضعیف و مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها می‌گردد (۶). بیشترین عامل مرتبط با پاتوفیزیولوژی واریکوسل استرس اکسیداتیو است. می‌توان نتیجه گرفت که ناهنجاری اسپرم در بیماران مبتلا به واریکوسل می‌تواند چندعاملی باشد و آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو یکی از دلایل اصلی بالقوه است (۱۹). در مطالعه حاضر، القاء واریکوسل سمت چپ باعث تغییرات بیوشیمیایی و تغییرات قابل توجهی در پارامترهای اسپرم در موش صحرایی نر شد. واریکوسل باعث آسیب به بیضه شده و اسپرماتوژنز را در مردان مختل می‌کند و باعث ناباروری در مردان می‌شود (۲۰،۲۱). با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیقات گذشته، القاء واریکوسل منجر به آسیب‌های اسپرمی شد و پارامترهای اسپرم را مختل کرد (۲۲). مطابق با سایر مطالعات، ما دریافتیم که القاء واریکوسل می‌تواند تعداد اسپرم، مورفولوژی، تحرک و زنده‌ماندن اسپرم را کاهش دهد، در حالی که باعث افزایش ناهنجاری اسپرم در موش صحرایی نر می‌شود (۲۳). تحقیقات نشان داده است که ارتباطی بین ناباروری ناشی از واریکوسل و استرس اکسیداتیو در موش صحرایی نر هست که باعث افزایش غلظت اکسیدان‌ها و کاهش غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها در مردان نابارور ارزیابی شده است که با تحرک اسپرم و درجه واریکوسل ارتباط دارد. دفاع آنتی‌اکسیدانی در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل کاهش می‌یابد و باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد شده، در حالی که حتی در موارد بارور مبتلا به واریکوسل، سطح بحرانی استرس اکسیداتیو وجود دارد و سطح بالاتر ممکن است باروری را مختل کند (۲۴،۲۵). آسیب اکسیداتیو با بیماری واریکوسل همراه است، بنابراین درمان با آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان یک روش درمانی مناسب در انواع اختلالات ناباروری در نظر گرفته می‌شود. در تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۴ توسط محققین انجام شد، مشخص گردید که عصاره گیاه زیرفون به عنوان یک پاک‌کننده رادیکال آزاد با خواص آنتی-اکسیدانی قوی می‌باشد (۲۶). گیاه زیرفون به عنوان یک داروی دیورتیک، درمان‌کننده زخم معده، ضداسپاسم، آرامش‌بخش و ماده‌ای برای سم‌زدایی بدن استفاده می-شود. این ویژگی به دارا بودن انواع مختلف ترکیبات فوتوشیمیایی شامل ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فلانوئیدها، لیگنان‌ها، فنل‌های ساده و اسیدهای فنولی و .... مربوط می‌شود (۲۷). بنابراین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه زیرفون با مقادیر بالای ترکیبات فنلی، به ویژه مشتقات کوئرستین ارتباط مستقیمی دارد. با این وجود، اثر قوی پاک‌کننده رادیکال-های آزاد گیاه زیرفون، به ویژه گلیکوزیدهای کوئرستین (روتین، کوئرسیترین و ایزوکوئسیترین)، گلیکوزیدهای کامپرول و اسیدهای فنلی (کافئین، اسیدهای کوماریک و کلروژنیک) قبلاً نشان داده شده است. گیاه زیرفون پتانسیل زیست‌شناختی بالایی از لحاظ فعالیت آنتی-اکسیدانی، ضدالتهاب و ضدتوموری دارد و هیچ اثر سمیت سلولی ندارد (۲۸). آنتی‌اکسیدان‌ها با منشاء گیاهان دارویی ممکن است اثر خود را بر سیستم‌های بیولوژیکی

از طریق مکانیسم‌های مختلفی اعمال کنند. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌هایی که در تعدادی از بیماری‌ها بررسی گردیدند، نشان دادند زمانی که بیماران در معرض آنتی-اکسیدان‌ها قرار گرفتند، میزان آسیب به سیستم‌های بیولوژیکی کاهش می‌یابد. گیاهان دارویی مقادیر قابل-توجهی از آنتی‌اکسیدان‌ها نظیر فلانوئیدها، فنول‌ها، ترکیبات فنولی و آلکالوئیدها را تولید می‌کنند که بدن را از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند. نتایج بررسی‌های انجام شده حاکی از آن است که گیاه زیرفون حاوی فلانوئیدها می‌باشد (۱۱). همچنین، با تحقیقاتی که Yayalaci و همکارانش در سال ۲۰۱۴ انجام دادند از نقش آنتی‌اکسیدانی گیاه زیرفون در برابر استرس اکسیداتیو گزارش می‌کند (۲۶). همچنین، طبق تحقیقاتی که Hemmati-Borujeni در سال ۲۰۲۰ انجام دادند نشان دادند عصاره زیرفون با خاصیت آنتی‌اکسیدانی، از تغییرات بافتی بیضه جلوگیری کرده و به صورت معناداری سبب افزایش شاخص جانسون (شاخص بافتی) در حیوانات نابارور شده است. مطالعه هیستوپاتولوژیک در بافت بیضه نشان داد که عصاره گیاه زیرفون به صورت معناداری ($p<۰/۰۰۱$) باعث کاهش ناباروری و از الگوی ساختاری طبیعی بافت بیضه محافظت می کند (۱).

نتایج ارزیابی اسپرم در مطالعه انجام شده افزایش و بهبود تعداد، مورفولوژی، تحرک و زنده‌ماندن اسپرم در موش‌های مبتلا به واریکوسل تحت‌تاثیر دوز مناسب عصاره گیاه زیرفون را نشان داد. با توجه به این یافته‌ها و تفاسیر می‌توان گفت احتمالا عصاره گیاه زیرفون تا حد زیادی می‌تواند آسیب‌های وارد شده را در شرایط استرس اکسیداتیو ناشی از واریکوسل بر پارامترهای اسپرم را کاهش دهد. این نتایج معنادار می‌تواند برای اثرات وابسته به دوز عصاره گیاه زیرفون بر روی پارامترهای اسپرم در موش های صحرایی نر مبتلا به واریکوسل تجربی به عنوان اطلاعاتی اساسی قلمداد گردد. همچنین، به نظر می‌رسد تیمار با عصاره گیاه زیرفون به میزان قابل‌توجهی اثرات محافظتی بر عملکرد بیضه ناشی از واریکوسل در موش های صحرایی نر را افزایش داده است. تحقیق حاضر نشان داد واریکوسل سبب آسیب به لوله‌های منی ساز و آتروفیه‌شدن بیضه می‌شود و عصاره گیاه زیرفون با خاصیت آنتی‌اکسیدانی اثرات آسیب‌رسان واریکوسل را تا حد زیادی می‌تواند جبران کند و باعث افزایش پارامترهای اسپرم شود. تحقیقات ما کاربرد بالینی احتمالی عصاره گیاه زیرفون را برای درمان برخی اختلالات بیضه ارائه داده است.

تقدیر و تشکر

از معاونت تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز برای حمایت از این تحقیق کمال تشکر و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

1. Hemmati-Borujeni, N., Eidi, A., Mortazavi, P., Oryan, S., 2020. Effect of *Tilia platyphyllos* on cadmium chloride-induced testicular damage in adult male wistar rats. The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Science 44(1): 270-275.
2. Chemes, H.E., Rawe, V.Y., 2010. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis. Cell Tissue Res 341(3): 349-357.
3. Redmon, J.B., Carey, P., Pryor, J.L., 2002. Varicocele--the most common cause of male factor infertility? Hum Reprod Update 8(1): 53-58.
4. Naughton, C.K., Nangia, A.K., Agarwal, A., 2001. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. Hum Reprod Update 7(5): 473-481.
5. Staub, C., Johnson, L., 2018. Review: Spermatogenesis in the bull. Animal 12(s1): s27-s35.
6. Hsu, G., Ling, P., Hsieh, C., Wang, C., Chen, C., Wen, H., Huang, H., Einhorn, E., Tseng, G., 2005. Outpatient varicocelectomy performed under local anesthesia. Asian J Androl 7(4): 439-444.
7. Kondo, Y., Ishikawa, T., Yamaguchi, K., Fujisawa, M., 2009. Predictors of improved seminal characteristics by varicocele repair. Andrologia 41(1): 20-23.
8. Azizollahi, G., Azizollahi, S., Babaei, H., Kianinejad, M., Baneshi, M. R., Nematollahi-mahani, S. N., 2013. Effects of supplement therapy on sperm parameters, protamine content and acrosomal integrity of varicocelectomized subjects. J Assist Reprod Genet 30(4): 593-599.

9. Mostafa, T., Anis, T.H., El-Nashar, A., Imam, H., Othman, I.A., 2001. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. Int J Androl 24(5): 261-265.
10. Evarte-Bundere, G., 2014. Analysis of some limiting ecological factors on the example of the distribution of the genus *Tilia* L. Cultivated in Latvia. Estonian Journal of Ecology 63(3): 185.
11. Zargari, A., 1997. Medicinal plants, Tehran, Tehran University Publications., 7th edition, Vol 1, pp. 399-402.
12. Duke, J.A., 2002. Handbook of Medicinal herbs. 2th ed. CRC Press, pp. 467-468.
13. Zeppa, S., Vallorani, L., Potenza, L., Bernardini, F., Pieretti, B., Guescini, M., Giomaro, G., Stocchi, V., 2000. Estimation of fungal biomass and transcript levels in *Tilia platyphyllos-Tuber borchii ectomycorrhizae*. FEMS Microbiol Lett 188(2): 119-124.
14. Cárdenas-Rodríguez, N., González-Trujano, M.V., Aguirre-Hernández, E., Ruíz-García, M., Sampieri, A., Coballase-Urrutia, E., Carmona-Aparicio, L., 2014. Anticonvulsant and antioxidant effects of *Tilia americana* var. mexicana and flavonoids constituents in the pentylenetetrazole-induced seizures. Oxid Med Cell Longev 2014: 329172.
15. Karioti, A., Chiarabini, L., Alachkar, A., Fawaz Chehna, M., Vincieri, F.F., Bilia, A.R., 2014. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS analyses of *Tiliae flos* and its preparations. J Pharm Biomed Anal 100: 205-214.
16. Turner, T.T., 2001. The study of varicocele through the use of animal models. Hum Reprod Update 7(1): 78-84.
17. Mortimer, D., Mortimer, S.T., 2013. Manual methods for sperm motility assessment. Methods Mol Biol 927: 61-75.
18. Schoor, R.A., 2001. The pathophysiology of varicocele-associated male infertility. Curr Urol Rep 2(6): 432-436.
19. Semercioz, A., Onur, R., Ogras, S., Orhan, I., 2003. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. Neuro Endocrinol Lett 24(1-2): 86-90.
20. Zha, W.L., Yu, W., Zhang, X., Zheng, Y.O., Cheng, F., Rao, T., Zhang, X.B., 2011. Effects of artery-ligating and artery-preserving varicocelectomy on ipsilateral epididymis of varicocele-induced rats. Urology 77(4): 1008.e9-1008.e15.
21. El-Kamshoushi, A.M., Zohdy, N.I., Abou Khedr, N.A., Nabhan, S.A., Mostafa, T., 2013. Ultrastructure of the seminiferous tubules in oligoasthenoteratozoospermic men associated with varicocele. Andrologia 45(5): 319-325.
22. Hassan, A., Gad, H.M., Mostafa, T., 2011. Radiologically assessed testicular changes in infertile males with varicocele. Andrologia 43(5): 307-311.
23. Mostafa, T., Rashed. L., Nabil, N., Amin, R., 2014. Seminal BAX and BCL2 gene and protein expressions in infertile men with varicocele. Urology 84(3): 590-595.
24. Mostafa, T., Anis, T., Imam, H., El-Nashar, A.R., Osman, I.A., 2009. Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. Andrologia 41(2): 125-129.
25. Abd-Elmoaty, M.A., Saleh, R., Sharma, R., Agarwal, A., 2010. Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. Fertil Steril 94(4): 1531-1534.
26. Yayalacı, Y., Celik, I., Batı, B., 2014. Hepatoprotective and antioxidant activity of linden (*Tilia platyphyllos* L.) infusion against ethanol-induced oxidative stress in rats. J Membr Biol 247(2): 181-188.
27. Toker, G., Aslan, M., Yeşilada, E., Memişoğlu, M., Ito, S., 2001. Comparative evaluation of the flavonoid content in officinal *Tiliae flos* and Turkish lime species for quality assessment. J Pharm Biomed Anal 26(1): 111-121.
28. Jabeur, I., Martins, N., Barros, L., Calhelha, R.C., Vaz, J., Achour, L ., Santos-Buelga, C ., Ferreira, I., 2017. Contribution of the phenolic composition to the antioxidant, anti-inflammatory and antitumor potential of *Equisetum giganteum* L. and *Tilia platyphyllos* Scop. Food Funct 8(3): 975-984.